

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Juni 2003 (05.06.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/045428 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 39/00**, (74) **Anwalt: BÖSL, Raphael**; Isenbruck Bösl Hörschler
C12N 5/10, A61P 35/00 Wichmann Huhn Possartstrasse 18, 81679 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/13531 (81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
29. November 2002 (29.11.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
60/334,491 30. November 2001 (30.11.2001) US
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MEDIGENE AKTIENGESellschaft**
[DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, 82152 Planegg/Martinsried (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): NIELAND, John**
[NL/DE]; Tellhöhe 18, 82131 Stockdorf (DE). **BREIDENSTEIN, Claudia** [DE/DE]; Eichendorffstrasse 28,
82140 Neu-Esting (DE). **DINKEL, Adelheid** [DE/DE]; Weinberger Strasse 48, 81241 München (DE). **SARTORIUS, Ute** [DE/DE]; Jahnstrasse 9, 82152 Krailling (DE).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/045428 A2

(54) **Title:** USE OF A TECHNICALLY MODIFIED CELL AS A VACCINE FOR TREATING TUMORAL DISEASE

(54) **Bezeichnung:** VERWENDUNG EINER TECHNISCH VERÄNDERTEN ZELLE ALS VAKZINE ZUR BEHANDLUNG EINER TUMORERKRANKUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of a technically modified cell in the treatment of a tumoral disease. The technically modified cell is not derived from the respective tumoral disease. The invention also relates to a medicament for the prophylaxis, therapy and/or secondary prophylaxis of a tumoral disease, containing a technically modified cell.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft die Verwendung einer technisch veränderten Zelle zur Behandlung einer Tumorerkrankung, wobei die technisch veränderte Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde, sowie ein Arzneimittel zur Prophylaxe, Therapie und/oder sekundären Prophylaxe einer Tumorerkrankung enthaltend eine technisch veränderte Zelle.

Verwendung einer technisch veränderten Zelle als Vakzine zur Behandlung einer Tumorerkrankung

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung einer technisch veränderten Zelle zur Behandlung einer Tumorerkrankung, wobei die technisch veränderte Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde, sowie ein Arzneimittel zur Prophylaxe, Therapie und/oder sekundären Prophylaxe einer Tumorerkrankung enthaltend eine technisch veränderte Zelle.

10

Die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems zur Behandlung und Prävention von Tumoren gilt als ein vielversprechender Ansatz in der modernen Krebstherapie. Entsprechende Therapeutika werden allgemein als Vakzine/Tumorvakzine bezeichnet. Das Ziel einer Tumorkvakzine ist es, eine Immunantwort auszulösen, die in der Lage ist, Tumorzellen spezifisch im Körper zu zerstören. Hier-
15 bei kann es sich sowohl um Tumorzellen des Primärtumors als auch um Metastasen des Tumors handeln.

Einige dieser Therapien setzen einzelne oder mehrere Antigene ein, die als Proteine, Peptide oder DNA-Expressionsvektoren vorliegen. Derartige Vakzine können
20 beispielsweise als Gemische einzelner Tumorantigene, z.B. Tumorzelllysate vorliegen.

Eine Gruppe von Tumorkvakzinen bilden die zellulären Vakzinen, die allgemein
25 als autologe und allogene Vakzine verwendet werden können (Pardoll DM (1998) Nat Med 4(5 Suppl):525-31; Wolchock JD und Livingston PO (2001) Lancet Oncol 2 (4):205-11; Schadendorf D et al. (2000) Immunol Lett 15;74(1):67-74) .

- 2 -

- Bei der autologen Vakzine werden Zellen vom patienteneigenen Tumor für die Herstellung der Vakzine verwendet. Dabei werden die Tumorzellen dem Körper entnommen, ggf. kultiviert und/oder modifiziert (gentechnisch oder biochemisch) und beispielsweise durch Bestrahlung proliferationsinkompetent gemacht, bevor sie dem Patienten wieder verabreicht werden. Ziel ist es, dass Immunzellen, insbesondere cytotoxische T-Zellen und Helfer-T-Zellen, die verabreichten Zellen erkennen und so eine Immunantwort auslösen, die sich dann auch gegen den Tumor bzw. davon abgeleitete Metastasen richten kann.
- 10 Der Vorteil einer autologen Vakzine ist, dass die Übereinstimmung der Tumorantigene zwischen den Vakzine-Zellen und den zu bekämpfenden Tumorzellen möglichst groß ist. Der Nachteil ist, dass jeder Patient eine individuell produzierte Vakzine benötigt und die Zeit, die zur Produktion einer solchen Vakzine benötigt wird, unter Umständen lang ist. Da die Mortalität von Tumorpatienten in vielen Tumorindikationen sehr hoch ist, ist eine lange Pause zwischen Diagnose/ Vorbereitung einer Therapie z.B. durch Entnahme von Zellen und einer anschließenden Vakzinierung nicht tolerierbar. Darüber hinaus ist eine individuelle Vakzine häufig aus Kostengründen nicht realisierbar.
- 20 Eine Alternative zur autologen Vakzinierung ist die sog. allogene Vakzinierung, d.h. die Immunisierung mit Zellen, die nicht vom selben Patienten, aber vom selben Tumortyp stammen. Bei dieser Vakzinierungsform unterscheiden sich die Vakzinezellen von den körpereigenen Tumorzellen des Patienten in zweierlei Hinsicht. Zum einen besitzen sie in der Regel nicht die identischen Transplantationsantigene (MHC-Gene), die bei der Interaktion zwischen Vakzinezelle und T-Zellen eine Rolle spielen. Zum anderen unterscheiden sich die Vakzinezellen und die zu bekämpfenden Tumorzellen in dem Muster der exprimierten Tumorantigene, da Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs auch unterschiedliche Tumorantigene exprimieren. Da sich die durch die Vakzinierung erhoffte Immunreaktion jedoch gegen bestimmte Tumorantigene richtet, ist eine möglichst große Überlap-
- 25
30

pung der Tumorantigenmuster bei allogenen Vakzinen für die Wirkung der Vakzine erwünscht bzw. notwendig.

Es konnte im Stand der Technik gezeigt werden, dass Tumorzellen desselben
5 Typs ähnliche Tumorantigenmuster exprimieren. Beispielsweise ist für das Melanom bekannt, dass Melanomzelllinien zumeist die Tumorantigene Tyrosinase, MART1/MelanA, Ny-ESO-1, MAGE3 und gp100 exprimieren (Peter I et al. (2001) Melanoma Research 11, 21-30). Diese Erkenntnis macht somit das Prinzip der allogenen Vakzinierung erst praktikabel, da eine große Wahrscheinlichkeit
10 besteht, dass ausreichend viele Tumorantigene zwischen Vakzinezelle und zu bekämpfender Tumorzelle identisch sind.

Weitere Kriterien für die Auswahl einer geeigneten Zelllinie für eine allogene Vakzine sind meist die Expressionsniveaus der Tumorantigene sowie die Expression weiterer Gene, z.B. der MHC Moleküle der Klassen 1 und 2, deren Haplotypen oder das Fehlen immuninhibitorischen Moleküle (wie IL10, TGF- β und Fas-Ligand).
15

Die Vorteile von allogenen Vakzinen sind, dass Patienten sofort bei gewünschtem
20 Therapiebeginn geimpft werden können, da im Gegensatz zur autologen Vakzinierung die Vakzine nicht individuell hergestellt werden muss. Darüber hinaus kann potentiell jeder Patient geimpft werden, wohingegen bei einer autologen Vakzine eine Anzahl von Patienten nicht geimpft werden können, da die Erfolgsrate für die Kultivierung von Tumorzellen des Patienten zumeist weit unter 100 %
25 liegt und ein Teil der Patienten bis zur Bereitstellung der Vakzine nicht mehr therapierbar ist.

Dennoch gibt es auch bei Ansätzen mit allogener Vakzinierung die Schwierigkeit, dass für jeden Tumortyp eine spezifische allogene Zelllinie erforderlich ist, um
30 eben wie oben erläutert eine möglichst große Überlappung der Tumorantigenmuster zu gewährleisten. Die Entwicklung einer spezifischen allogenen Vakzine ist

- 4 -

aus kommerziellen Gesichtspunkten bei verschiedenen Tumortypen mit eher niedrigen Patientenzahlen allerdings unattraktiv. Und auch für größere Indikationen wäre es insbesondere aus wirtschaftlichen Interessen vorteilhaft, nur ein Vakzine für so viele Patienten bzw. Tumoarten wie möglich zu besitzen.

5

Daher beruht die der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe darin, eine Vakzine zu entwickeln, die für eine große Zahl verschiedener Tumorerkrankungen und eine große Zahl von Tumorpatienten geeignet ist.

10 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung einer technisch veränderten Zelle zur Herstellung einer Vakzine zur Behandlung oder Vorbeugung einer Tumorerkrankung, wobei die technisch veränderte Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet ist.

15 Unter einer technisch veränderten (dt. Übersetzung von *engineered*) Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Zelle verstanden, die aus einem Organismus isoliert wurde und an die Kultivierung in Zellkultur adaptiert wurde. Hierunter sind Maßnahmen der Subklonierung, Adaptation an bestimmte Wachstumsbedingungen wie Temperatur, Medien oder Medienzusätze wie Wachstumsfaktoren, Cytokine etc. zu verstehen. Technisch veränderte Zellen sind damit auch
20 Zellen, die mit löslichen Stoffen wie Wachstumsfaktoren oder Cytokine behandelt wurden und die daraufhin ein anderes Expressionsmuster bezüglich eines Proteins zeigen.

25 Ferner können derartige technisch veränderte Zellen gentechnisch verändert worden sein. Gentechnische Veränderungen umfassen das Einschleusen von genetischem Material in Form von DNA oder RNA, beispielsweise zur Expression von Transgenen.

Bevorzugt handelt es sich bei der technisch veränderten Zelle um eine eukaryontische Zelle, besonders bevorzugt um eine Säugerzelle, insbesondere um eine humane Zelle.

- 5 Insbesondere betrifft der Ausdruck „technisch veränderte Zelle“ aus Tumoren gewonnenen Zellen sowie von Tumorzellen abgeleitete Zelllinien.

Im Sinne der Erfindung bedeutet „abgeleitet“, dass ausgehend von einer einzelnen Tumorzelle bzw. einzelnen Tumorzellen eine oder mehrere Zelllinie(n) generiert
10 wird (werden). Derartige Verfahren sind im Stand der Technik beschrieben.

Im Sinne der Erfindung bedeutet „Tumorzelle“ sowohl eine direkt aus dem Tumor gewonnene Zelle als auch eine Zelle, die von der aus dem Tumor gewonnenen Zelle abgeleitet wurde, indem die aus dem Tumor gewonnene Zelle weiterkulti-
15 viert wurde. Verfahren zur Kultivierung von Zellen aus Tumoren sind im Stand der Technik bekannt.

Die erfindungsgemäße Verwendung technisch veränderter Zellen zur Herstellung einer Vakzine hat den Vorteil, dass die hergestellte Vakzine für die Behandlung
20 verschiedener Tumorerkrankungen geeignet ist. Dieser neuartige Vakzinierungsansatz ermöglicht es, die Entwicklungs- wie auch die Herstellungskosten von Vakzinen insbesondere bei selteneren Tumorindikationen dramatisch zu reduzieren und macht somit eine Entwicklung erst ökonomisch attraktiv.

25 Eine bevorzugte technisch veränderte Zelle gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mindestens ein, vorzugsweise mehrere Tumorantigene insbesondere endogen (also nicht über eine gentechnische Veränderung eingebracht) exprimiert.

30 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform exprimiert die Zelle embryonale Tumorantigene.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform exprimiert die Zelle mindestens 4, bevorzugt mindestens 7, insbesondere mindestens 10 Tumorantigene ausgewählt aus der Gruppe enthaltend Ny-ESO-1, CEA1, CEA2, CEA3, α -feto Protein, MAGE X2, BAGE, GAGE1, GAGE2, GAGE3, GAGE4, GAGE5, GAGE6, GAGE7, GAGE7a, GAGE8, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12, MAGE1, MAGE2, MAGE3, MAGE3b, MAGE4a, MAGE4b, MAGE5, MAGE5a, MAGE5b, MAGE6, MAGE7, MAGE8, MAGE9, PAGE1, PAGE4, CAMEL, PRAME, LAGE1, gp100 und p53.

Es wurde gezeigt, dass während der Tumorentwicklung die charakteristischen Gene, die im Endstadium des Tumors exprimiert sind, embryonale Tumorantigene wie Proteine der oben genannte Gruppe sind, insbesondere Proteine der MAGE-Familie, CEA, NY-ESO-1 und α -feto Protein. Die Auswahl einer Vakzinezelle hinsichtlich der Expression dieser embryonalen Tumorantigene lenkt somit die Immunantwort spezifisch auf Tumoren im Endstadium (bzw. weniger differenzierte Tumore) und/oder Metastasen. Im Gegensatz dazu sind zelluläre Vakzine, die aus stärker differenzierten Tumoren, also früheren Tumorstadien, hergestellt wurden, nur gegen solche stärker differenzierten Tumore gerichtet, was insbesondere zu einer „Fluchtmöglichkeit“ für Metastasen führt, da diese in der Regel kaum noch differenziert sind. Daher sind bevorzugte Tumorantigene einer zellulären Vakzine solche der MAGE-Familie, CEA, NY-ESO-1 und α -feto Protein.

Technisch veränderte Zellen gemäß der vorliegenden Erfindung sind vorzugsweise Tumorzellen, vor allem Hodentumorzellen (siehe z.B. Klade CS et al. (2002) Int J Cancer 10, 97: 217-24) oder embryonale Tumorzellen (Rossant J. and Papaioannou V.E. (1984) Cell Differ 15(2-4):155-61; Damjanov, I. (1990) Cancer Surv. 9(2): 303-19), sowie von derartigen Tumoren abgeleitete Zellen. Hodentumorzellen umfassen Tumorzellen von geminativen Hodentumoren, von einem Seminom, von einem embryonalen Karzinom oder einem entdifferenzierten Te-

- 7 -

ratom oder Teratokarzinom, und Chorionkarzinom. Insbesondere bevorzugt sind Zellen abstammend von einem embryonalen Karzinom oder einem Teratokarzinom.

- 5 Damit betrifft die Erfindung insbesondere die Verwendung einer Hodentumorzelle, einer embryonalen Tumorzelle oder von Zellen aus von Hodentumorzellen oder embryonalen Tumorzellen abgeleiteten Zelllinien zur Herstellung einer Vakzine zur Vorbeugung oder Behandlung einer Tumorerkrankung, wobei die verwendete Zelle und die Tumorerkrankung nicht vom gleichen Tumortyp stammen.

10

- Überraschenderweise sind Hodentumorzellen oder embryonale Tumorzellen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer großen Vielfalt verschiedener Tumortypen ganz besonders geeignet, da sie in der Lage sind, eine Vielzahl von verschiedenen T-Zellen zu aktivieren. Diese besondere Eignung liegt insbesondere daran, dass diese Tumorzellen eine große Anzahl an embryonalen Antigenen exprimierten, die von differenzierten Zellen nicht mehr exprimiert werden. Diese Antigene werden durch diese Zellen präsentiert und können in einer Vakzinierungssituation eine spezifische Immunreaktion auslösen, die gegen sämtliche Zellen gerichtet ist, die diese embryonalen (Tumor-)Antigene exprimieren.

20

- Da - wie oben beschrieben - Tumoren bzw. Metastasen während ihrer Tumorentwicklung eine zunehmende Anzahl embryonaler (Tumor-)Antigene exprimieren, ist die Wahrscheinlichkeit besonders groß, dass eine gewisse Übereinstimmung der exprimierten Antigene zwischen Vakzinazelle und Tumorzelle vorliegt und somit eine spezifische Immunantwort gegen die Tumorzelle ausgelöst wird.

25

- Basis dieses Mechanismus ist, dass die negative Selektion der spezifischen T-Zellen gegen die "Selbst-Antigene" erst stattfindet, nachdem die Expression der embryonalen Antigene abgeschaltet wurde (Janeway C. et al. (1999) Immunobiology: the immune system in health and disease, 4th ed., Current Biology Publications, New York, insbesondere Seiten 227, 233, 241-257). Wäre dies nicht der

30

- 8 -

Fall, so wäre der Körper prinzipiell nicht in der Lage, eine Immunantwort gegen ein embryonales Antigen zu generieren.

Darüber hinaus können immortale Zellen, die vorzugsweise eine große Zahl von
5 Tumorantigenen exprimieren, verwendet werden. Methoden zur Immortalisierung solcher Zellen sind im Stand der Technik z.B. aus WO 97/00946 oder Katakura Y. et al. (1998, Methods Cell Biol. 57:69-91) bekannt. Vorzugsweise können Stammzellen, besonders embryonale Stammzellen, verwendet werden.

10 Erfindungsgemäß ist es möglich, die Immunogenität der Vakzinezellen dadurch zu verbessern, dass sie Cytokine, Chemokine und/oder kostimulatorische Moleküle exprimieren.

Bevorzugte technisch veränderte Zellen sind solche, die durch genetische Modifi-
15 kation verändert wurden. Solch eine genetische Modifikation kann beispielsweise zu einer Immortalisierung der Zellen oder dem Ausschalten bzw. Herunterregulieren der Expression bestimmter ungewünschter Gene wie z.B. immunsuppressiver Moleküle (wie IL10, TGF- β und Fas-Ligand) führen. Ferner können die Zellen so modifiziert werden, dass sie ein oder mehrere Moleküle aus der Grup-
20 pen enthaltend Cytokine, Chemokine und/oder kostimulatorische Moleküle exprimieren.

Methoden zum Ausschalten bzw. Herunterregulieren der Expression von Genen sind dem Fachmann bekannt. Als Beispiel sind hier Ribozyme (Usman N. und
25 Blitt L.M. (2000) J. Clinical Investigation 106(10): 1197-1202), antisense RNAs (Branch A.D. (1996) Hepatology 24: 1517-29) oder die RNAi-Technologie (Tuschl T. et al. (1999) Genes & Development 13: 3191-3197, O'Neil N.J. et al. (2001) Am. J. Pharmacogenomics 1(1): 54-53) zu nennen.

30 Die Cytokine und/oder Chemokine können ausgewählt werden aus der Gruppe enthaltend GM-CSF, G-CSF, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10,

IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL21, IL22, IFN α , IFN β , IFN γ , Flt3 L, Flt3, TNF α , RANTES, MIP1 α , MIP1 β , MIP1 γ , MIP1 δ , MIP2, MIP2 α , MIP2 β , MIP3 α , MIP3 β , MIP4, MIP5, MCP1, MCP1 β , MCP2, MCP3, MCP4, MCP5, MCP6, 6cykine, Dcck1 und DCDF. Bevorzugte Cytokine/Chemokine sind GM-CSF, RANTES und/oder MIP1 α .

Kostimulatorische Moleküle können ausgewählt werden aus der Gruppe enthaltend B7.1, B7.2, CD40, Light, Ox40, 4.1.BB, Icos L, SLAM, ICAM 1, LFA-3, B7.3, CD70, HSA, CD84, CD7, B7 RP-1 L, MAdCAM-1, VCAM-1, CS-1, CD82, CD30, CD120a, CD120b, TNFR-RP, CD40L, Ox40L und Rae-1, wobei B7.1 und B7.2 bevorzugte kostimulatorische Moleküle sind.

Eine weitere Ausführungsform dieser Erfindung ist, dass solche exprimierten Cytokine, Chemokine oder kostimulatorischen Moleküle mutiert sind. Solche Mutationen beinhalten, ohne darauf beschränkt zu sein, Punktmutationen, Deletionen, Insertionen oder Fusionen mit anderen Peptiden oder Proteinen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die technisch veränderte Zelle auch ein Fusionsprotein aus den oben genannten Cytokinen, Chemokinen oder kostimulatorischen Molekülen exprimieren. Ferner ist erfindungsgemäß eingeschlossen, dass die Zelle funktionelle Varianten der oben genannten Polypeptide exprimiert, wobei sich funktionelle Varianten dadurch auszeichnen, dass sie im Wesentlichen die gleiche biologische Aktivität wie die genannten Polypeptide aufweisen. Im Stand der Technik sind zu den jeweiligen Polypeptiden Tests bekannt, mit deren Hilfe die Polypeptide nachgewiesen bzw. deren jeweilige Aktivität gemessen werden kann.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform exprimiert die technisch veränderte Zelle B7.2 und GM-CSF, da die Kombination dieser beiden Moleküle zu einer überraschend hohen Wirksamkeit der Vakzine führt.

Verfahren zur genetischen Veränderung von Zellen sind im Stand der Technik gut bekannt. Bevorzugte Ausführungsformen sind Zellen, die mit mindestens einer Nukleinsäure stabil transfiziert sind, die für mindestens ein Cytokin, Chemokin oder kostimulatorisches Molekül kodiert. Das bedeutet, dass die für ein solches
5 Cytokin, Chemokin oder kostimulatorisches Molekül kodierende Nukleinsäure in das Genom der Zelle integriert ist und daher während des S-Phasen-Übergangs der Zelle dupliziert und auf die Tochterzellen im Rahmen der normalen Chromatidentrennung weitergegeben wird. Darüber hinaus können stabil transfizierte Zellen durch episomale Nukleinsäuren erhalten werden, die einer von der Zellreplikationmaschinerie unabhängigen Replikation unterliegen. Beispiele für solche
10 autonomen Replikationssysteme sind z.B. virale Replikationssysteme enthaltend ein Initiatorprotein wie SV40 large T-Antigen oder EBNA1 und einen Replikationsstartpunkt wie SV40ori oder EBV oriP.

15 Eine andere Möglichkeit, um die Expression solcher Cytokine, Chemokine oder kostimulatorischen Moleküle zu erhalten, ist ein episomal replizierendes Plasmid, das einen selektierbaren Marker enthält, und die Selektion auf diesen Marker.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird die Expression solcher Cytokine, Chemokine oder kostimulatorischen Moleküle durch einen konstitutiven Promotor, beispielsweise den CMV Promotor (Vincent et al (1990) Vaccine 90, 353, den SV40-Promotor (Samulski et al (1989) J Virol 63, 3822) oder den LTR-Promotor von Retroviren (Lipkowski et al (1988) Mol Cell Biol 8, 3988), durch
20 einen induzierbaren Promotor, beispielsweise den tet-Promotor, und/oder durch einen gewebespezifischen Promotor, beispielsweise den Elongation Factor Promotor, den Ig Promotor oder den IL2/NFAT Promotor, kontrolliert.
25

Zur Transfektion der technisch veränderten Zellen kann ein Standardplasmid verwendet werden, das eine kodierende Nukleinsäure, vorzugsweise eine DNA, und
30 zumindest ein regulatorisches Element wie einen Promotor oder einen Enhancer enthält. Die Transfektion kann beispielsweise durch Calciumphosphat-

Transfektion, Elektroporation oder liposomale Transfektion durchgeführt werden. Darüber hinaus können zur Transfektion der Zellen virale Vektoren wie beispielsweise das Herpes Simplex Virus (HSV), Amplicon, adenoassoziiertes Virus (AAV), ein Adenovirus oder Retrovirus verwendet werden. Beispielsweise offenbart US 6,171,597, das hiermit als Referenz eingeschlossen wird, geeignete AAV-Vektoren zur Herstellung von Zellen, die mindestens ein Cytokin exprimieren.

AAV ist zur Transfektion der Zellen deshalb bevorzugt, da sich dieses Virus besonders gut für die Integration von Transgenen in das Zellgenom eignet. Bevorzugt liegt/liegen das/die Transgene integriert in die AAV-S1 Akzeptorstelle vor, insbesondere in Form von Konkatemeren. Eine Integration von Konkatemeren des/der Transgene hat den Vorteil, dass eine derartige Vervielfachung der Gene zu einer stärkeren Expression der Transgene führt. Sofern sich die technisch veränderte Zelle nicht durch einen natürlich vorkommenden AAV-Serotyp, insbesondere AAV-2, infizieren lässt, so können Kapsidmutanten hergestellt werden, mit Hilfe derer eine Infektion der Zelle durchgeführt werden kann (siehe WO 99/67393).

Bevorzugte Tumorkrankheiten, die behandelt werden können, sind Melanom, Eierstockkrebs, Brustkrebs, Kolonkarzinom, Leukämie, Lymphom, Nierenkarzinom, Lungenkarzinom, Prostatakarzinom, zervikales Karzinom, Neuroblastom, Osteosarkom, Thymom, Hepatom, Kehlkopfkrebs, Analkrebs, Magenkrebs, Schilddrüsenkrebs, Seminom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Mesotheliom und/oder Gehirntumor.

Eine solche Behandlung kann mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie oder einer chirurgischen Entfernung des Tumors oder einer Metastase kombiniert werden.

Solche Zellen können als Arzneimittel verwendet werden, das als prophylaktische Vakzinierung, als eine Therapie bei einem vorhandenen Tumor oder als eine se-

kundäre Prophylaxe angewandt wird, wobei der primäre Tumor und/oder eine oder mehrere Metastasen durch einen chirurgischen Eingriff, Chemotherapie oder Bestrahlung entfernt wurden und das Risiko für das Wiederauftreten eines Tumors reduziert werden soll.

5

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäß verwendete Zelle proliferationsinkompetent, beispielsweise durch Bestrahlung oder chemische Inaktivierung. Es ist beispielsweise bekannt, dass Tumorzellen durch eine gamma-Bestrahlung mit 25-100 Gy proliferationsinkompetent werden (siehe z.B. 10 WP 97/32988). Für eine chemische Inaktivierung kann beispielsweise die Zugabe von 40 µg/ml Mitomycin verwendet werden. Unter „proliferationsinkompetent“ wird erfindungsgemäß verstanden, dass die Tumorzelle nicht mehr in der Lage ist, zu proliferieren.

15 Die durch die erfindungsgemäße Verwendung hergestellte Vakzine dient dazu, im Patienten eine Immunantwort auszulösen. In manchen Fällen ist es dazu nicht erforderlich, dass das Arzneimittel zusätzlich ein Adjuvans enthält. Dabei ist im Rahmen der Erfindung ein Adjuvans als eine Verbindung definiert, welche das Auslösen einer Immunantwort verstärken kann.

20

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Arzneimittel zusätzlich ein Adjuvans, das ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend AIOH, CpG, doppelsträngige RNA; oxidiertes oder reduziertes Glutathion, BCG, Salmonella, komplettes Freundsches Adjuvans, inkomplettes Freundsches Adjuvans, Cytokine 25 oder Chemokine wie z.B. lösliche Proteine, Iscome oder spezifische Antikörper für CD40, toll-artige Rezeptoren (stimulierend) oder CTLA4 (blockierend).

Vorzugsweise werden solche Adjuvantien verwendet, die als Toll-Like-Receptor-Agonisten wirken. Dies sind z.B. CpG Oligonukleotide. Hierbei handelt es sich 30 um Oligonukleotide, die mindestens ein CpG Motiv enthalten (siehe z.B. Wagner H (2001) Immunity 14, 499-502). Ferner fallen unter diese Definition Lipopoly-

saccharide (LPS) bzw. Komponenten davon, wie z.B. der Lipid A-Anteil oder der Poly- oder Oligosaccharidanteil. LPS sind die hauptsächlichen Außenmembrankomponenten von nahezu allen Gram-negativen Bakterien und sind dafür bekannt, als starke Stimulatoren des Immunsystems zu wirken. LPS bestehen aus einer

5 Poly- oder Oligosaccharidregion, die durch das Lipid A in der äußeren Bakterienmembran verankert sind. Die spezifische, zelluläre Erkennung des LPS/Lipid A wird durch die gemeinsame extrazelluläre Interaktion des LPS binding protein, dem membrangebundenen oder der löslichen Form von CD14 und dem Toll-like receptor 4*MD2-Komplex vermittelt. Dies führt zu einer raschen Aktivierung

10 eines intrazellulären Signalnetzwerks, das zu der Signaltransduktionskaskade homolog zu dem von IL-1 und IL-8 führt (Alexander C and Rietschel ET (2001) J Endotoxin Res 7, 3, 167-202).

Ferner umfasst die Erfindung die Verwendung eines Adjuvans, das von Bacillus

15 Calmette-Guerin cell wall skeleton (BCG-CWS) abgeleitet ist. Von BCG-CWS ist bekannt, dass es ein Ligand der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 ist und die Differenzierung von Immunzellen auslösen kann (Matsumoto M et al (2001) Int Immunopharmacol 1, 8, 1559-69).

20 Ferner umfasst die Erfindung die Verwendung von mindestens einem Superantigen als Adjuvans. Superantigene sind Antigene, die direkt an T-Zellrezeptoren und MHC-Moleküle binden und eine direkte Aktivierung der T-Zellen bewirken. Von diesen ist bekannt, dass diese auch eine adjuvante Wirkung haben können (siehe z.B. Okamoto S et al (2001) Infect. Immun. 69,11, 6633-42). Bekannte Superantigene sind z.B. *Staphylococcus aureus* Enterotoxine A, B, C, D und E

25 (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), *Staphylococcal aureus* toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), *Staphylococcal* exfoliating toxin oder *Streptococcal* pyrogenic exotoxins.

30 Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung von Agentien, die die Signaltransduktionskaskade von CTLA-4 inhibieren. Dabei kann es

- 14 -

sich um Antikörper oder Antikörperfragmente handeln, die spezifisch an die extrazelluläre Domäne von CTLA-4 binden und dessen Signaltransduktionskaskade inhibieren. Die Generierung bzw. das Screening derartiger Antikörper bzw. Antikörperfragmente ist dem Fachmann bekannt (siehe z.B. WO 0032231). Weitere
5 Agenzien, die geeignet sind, CTLA-4 zu binden und dessen Signaling zu inhibieren, sind kleine organische Moleküle, Peptidanaloga oder lösliche T-Zellrezeptoren (siehe WO 97/20574).

Die Herstellung von Vakzinen enthaltend erfindungsgemäße technisch veränderte
10 Zellen bzw. deren Einsatz bei der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt in üblicher Weise anhand geläufiger pharmazeutisch-technologischer Verfahren. Dazu werden die technisch veränderten Zellen zusammen mit geeigneten, pharmazeutisch annehmbaren Hilfs- und Trägerstoffen zu den für die verschiedenen Indikationen und Applikationsorte geeigneten Arzneiformen verarbeitet.

15 Bevorzugte Hilfs- und Trägerstoffe sind Additive, Stabilisatoren und/oder Bindemittel. Hierzu zählen insbesondere Proteine, Peptide und Aminosäuren wie z.B. humane Plasmaproteine, insbesondere Albumin, aber auch rekombinantes Serumalbumin, des Weiteren Proteaseinhibitoren wie z.B. Aprotinin, ϵ -Aminocarbonsäure, Pepstatin A, EDTA oder EGTA. Ferner gehören zu dieser Gruppe
20 Salze wie insbesondere Natriumchlorid, Natriumoctanoat, Natriumcaprylat und Natriumacetyltryptophanat. Weitere geeignete Zusätze sind Ethanol oder DMSO.

Zur Einstellung des pH-Wertes können beispielsweise osmotisch wirksame Säuren und Laugen, z.B. Salzsäure, Zitronensäure, Natronlauge, Kalilauge, Natriumhydrogencarbonat, ferner Puffersysteme, wie z.B. Citrat, Phosphat, Tris-Puffer, HEPES-Puffer, MOPS-Puffer oder Triethanolamin verwendet werden.

Eine bevorzugte Formulierung einer erfindungsgemäßen Vakzine enthält ca. 10^6
30 bis 5×10^8 Zellen in einem Volumen von 0,1 bis 10 ml, insbesondere 0,5 bis 5 ml einer physiologischen Kochsalzlösung mit Hilfs- und Trägerstoffen, z.B. einer

- 15 -

Infusionslösung. Geeignete Infusionslösungen sind z.B. „Human Albumin 20% Immuno“ von Baxter, Unterschleißheim (1000 ml Infusionslösung enthalten: 200 g Plasmaproteine vom Menschen mit mind. 95% Albumin, 3,0 g Natriumchlorid, 2,7 g Natriumoctanoat, 4,3 g Natriumacetyltryptophanat) oder „Human-Albumin
5 20 % Behring“ von Aventis Behring, Marburg (1000 ml Infusionslösung enthalten: 200g Plasmaproteine vom Menschen mit mind. 96% Albumin, 125 mmol Natrium-Ionen, max. 2 mmol Kalium-Ionen, max. 2 mmol Calcium-Ionen, max. 100 mmol Chlorid-Ionen, 16 mmol Octanoat-Ionen, 16 mmol N¹-Acetyl-D-/L-Tryptophanat).

10 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Arzneimittel zur Prophylaxe, Therapie und/oder sekundären Prophylaxe einer Tumorerkrankung enthaltend eine wie oben definierte technisch veränderte Zelle.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Arzneimittel zusätzlich
15 mindestens ein Adjuvans ausgewählt aus der Gruppe enthaltend CpG, oxidiertes oder reduziertes Glutathion, BCG, Salmonella, komplettes Freundsches Adjuvans, inkomplettes Freundsches Adjuvans, Cytokine oder Chemokine, z.B. lösliche Proteine, Iscome oder spezifische Antikörper gegen CD40, Toll-artige Rezeptoren (aktivierend) oder CTLA4 (blockierend).

20 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Arzneimittel dazu geeignet, subkutan, intrakutan, intravenös oder intranodal verabreicht zu werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Patient ein Säu-
25 getier, vorzugsweise ein Mensch.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeu-
gung einer Tumorerkrankung, bei dem einem Patienten eine wirksame Menge
einer technisch veränderten Zelle verabreicht wird, wobei die technisch veränderte
30 Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde.

- 16 -

Die oben aufgeführten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verwendung gelten auch für das erfindungsgemäße Verfahren.

Wie oben im Detail ausgeführt hat es sich im Rahmen der Erfindung überraschen-
5 derweise herausgestellt, dass Zellen, die embryonale Tumorantigene exprimieren, besonders für die Behandlung von Tumoren im Endstadium geeignet sind.

Daher betrifft die Erfindung auch die Verwendung einer mindestens ein embryo-
nales Tumorantigen exprimierenden Zelle zur Herstellung einer Vakzine zur Be-
10 handlung von Tumorerkrankungen im Endstadium, wobei die Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform exprimiert die Zelle mindestens 3
embryonale Tumorantigene.

15

Die oben aufgeführten Ausführungsformen der anderen erfindungsgemäßen Ver-
wendung gelten auch für diese erfindungsgemäße Verwendung.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu be-
20 schränken.

Beispiel 1**Expression von Tumorantigenen durch embryonale Tumorzelllinien**

Um zu untersuchen, ob prinzipiell eine Hodentumor- oder embryonale Tumorzelllinie dazu geeignet ist, wurde untersucht, ob diese tatsächlich mehr Tumorantigene exprimiert als Tumorzellen von herkömmlichen soliden Tumoren. Folgende Zelllinien wurden untersucht:

	F9	Embryokarzinom (Haplotyp: H2-b) (ATCC CRL-1720)
10	B16F10	Melanom (C57/Bl6, H2-b) (ATCC CRL-6475)
	CT26	Kolonkarzinom (Balb/c, H2-d) (ATCC CRC 2638)
	K1735	Melanom (C3H, H2-k) (Staroselsky AH et al. (1991) Cancer Res. 51, 6292-98)
15	Renca	Nierenkarzinom (Balb/c, H2-d) (Murphy, GP and WJ Hrushesky (1973) J Natl Cancer Inst 50:1013-25).

Die Analyse hinsichtlich der Expression bekannter Tumorantigene erfolgte mittels der Array-Technologie von Affymetrix (Santa Clara, CA, USA). Hierzu wurden 50 µg Gesamt-RNA der oben genannten Zellen mittels RNeasy Mini Säulen (Qiagen, Hilden) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. 5 µg der gereinigten Gesamt-RNA wurden eingesetzt, um den ersten und zweiten Strang der cDNA zu synthetisieren. Anschließend wurde diese cDNA eingesetzt, um biotinylierte cRNA-Proben herzustellen, wie dies vom Hersteller Affymetrix empfohlen ist. 15 µg der fragmentierten, markierten cRNA wurde zur Hybridisierung von Gene Chip® Arrays verwendet, die das Mausgenom repräsentieren (U74A). Anschließend wurden die Hybridisierungssignale mit einem Biotin-markierten anti-Streptavidin-Antikörper und durch einen weiteren SAPE-Färbungsschritt verstärkt. Die Daten wurden mittels Microarray Suite und Data Mining Tool Software (Affymetrix) analysiert. Der verwendete Chip U74A repräsentiert

12.588 Transkripte des murinen Genoms, die sich aus ca. 6000 funktionell charakterisierten Sequenzen der Maus UniGene Datenbank(Build 74) und weiteren ca. 6000 EST Klustern zusammensetzen.

- 5 Mittels dieser Technologie wurden die Zelllinien F9, B16F10, CT26, K1735 und Renca verglichen. Hinsichtlich der exprimierten, bekannten Tumorantigene konnte gezeigt werden, dass F9-Zellen nahezu alle bekannten Tumorantigene, auf die in dem Array getestet wurde, exprimieren, hingegen die Zellen B16F10, CT26, K1735 und Renca eine Reihe von wichtigen Tumorantigen nicht exprimieren.
- 10

Tumorantigene, die von allen 5 getesteten Zelllinien exprimiert werden, sind:

Cluster Incl	Name	No.
J04509:	Jun proto-oncogene related gene d1	/cds=(121,1146) /gb=J04509 /gi=198486 /ug=Mm.1175 /len=1147
D63707:	Mouse mRNA for hepatoma derived growth factor (HDGF), complete cds	/cds=(61,774) /gb=D63707 /gi=945418 /ug=Mm.1141 /len=1563
U35142:	Mus musculus retinoblastoma-binding protein (mRbAp46) mRNA, complete cds	/cds=(259,1536) /gb=U35142 /gi=1016276 /ug=Mm.1603 /len=1748
X79233:	Ewing sarcoma homolog	/cds=(56,2023) /gb=X79233 /gi=488512 /ug=Mm.22691 /len=2188
X89650:	RAB7, member RAS oncogene family	/cds=(156,779) /gb=X89650 /gi=1050550 /ug=Mm.4268 /len=2089
M61909:	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene homolog A	/cds=(60,1709) /gb=M61909 /gi=200025 /ug=Mm.28170 /len=2424
D63707:	Mouse mRNA for hepatoma derived growth factor (HDGF), complete cds	/cds=(61,774) /gb=D63707 /gi=945418 /ug=Mm.1141 /len=1563
AF011644:	Mus musculus oral tumor suppressor homolog (Doc-1) mRNA, partial cds	/cds=(0,330) /gb=AF011644 /gi=2305225

		/ug=Mm.35847 /len=981
U35141:	Mus musculus retinoblastoma-binding protein (mRbAp48) mRNA, complete cds	/cds=(107,1492) /gb=U35141 /gi=1016274 /ug=Mm.12145 /len=1961
X51528:	Tissue specific transplantation antigen P198-7	/cds=(18,629) /gb=X51528 /gi=55049 /ug=Mm.13020 /len=654
Y13361:	RAB7, member RAS oncogene family, pseudogene 1	/cds=(0,623) /gb=Y13361 /gi=2168154 /ug=Mm.87807 /len=624
Z50013:	Harvey rat sarcoma virus oncogene	/cds=(0,569) /gb=Z50013 /gi=895862 /ug=Mm.6793 /len=570 /NOTE=replacement for probe set(s) 101005_at on MG-U74A
AB021961:	Mus musculus mutant p53 mRNA, complete cds	/cds=(100,1272) /gb=AB021961 /gi=5421849 /ug=Mm.222 /len=1429
AF012923:	Mus musculus p53-inducible zinc finger protein (Wig-1) mRNA, complete cds	/cds=(173,1045) /gb=AF012923 /gi=2804680 /ug=Mm.35705 /len=7661
U28789:	Mus musculus p53-associated cellular protein PACT mRNA, partial cds	/cds=(0,4764) /gb=U28789 /gi=1546778 /ug=Mm.4480 /len=5191
Z22819:	RAB24, member RAS oncogene family	/cds=(0,611) /gb=Z22819 /gi=438163 /ug=Mm.18800 /len=660
AI850893:	UI-M-BH0-ajt-g-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3' end	/clone=UI-M-BH0-ajt-g-07-0-UI /clone_end=3 /gb=AI850893 /gi=5494799 /ug=Mm.29105 /len=375
M21019:	Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R	/cds=(11,667) /gb=M21019 /gi=200676 /ug=Mm.257 /len=949
X65687:	Thymoma viral proto-oncogene	/cds=(283,1725) /gb=X65687 /gi=287806 /ug=Mm.6645 /len=2626
AB021961:	Mus musculus mutant p53 mRNA, complete cds	/cds=(100,1272) /gb=AB021961 /gi=5421849 /ug=Mm.222 /len=1429

- 20 -

L26528:	RAB11B, member RAS oncogene family	/cds=(35,691) /gb=L26528 /gi=433063 /ug=Mm.35727 /len=1763
L00039:	Myelocytomatosis oncogene	/cds=(15,1334) /gb=L00039 /gi=192621 /ug=Mm.2444 /len=1707
L11316:	Ect2 oncogene	/cds=(530,2746) /gb=L11316 /gi=293331 /ug=Mm.2995 /len=3920
U22445:	Thymoma viral proto-oncogene 2	/cds=(216,1661) /gb=U22445 /gi=942577 /ug=Mm.8901 /len=1741 /NOTE=replacement for probe set(s) 101556_at on MG-U74A
X93357:	Synovial sarcoma, translocated to X Chromosome	/cds=(179,1435) /gb=X93357 /gi=1072383 /ug=Mm.4296 /len=3107
D29639:	Mouse embryonal carcinoma cell mRNA for 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase, complete cds	/cds=(53,964) /gb=D29639 /gi=1125025 /ug=Mm.2491 /len=1679
AF069051:	Mus musculus pituitary tumor transfor- ming gene protein (PTTG) mRNA, com- plete cds	/cds=(303,893) /gb=AF069051 /gi=3702843 /ug=Mm.6856 /len=945
U13371:	Mus musculus (C57BL/10 X C3H)F2 clo- ne 1.5 novel mRNA from renin-expressing kidney tumor cell line, partial sequence	/cds=UNKNOWN /gb=U13371 /gi=987223 /ug=Mm.1314 /len=1217
X74671:	Neurofibromatosis 2	/cds=(576,2366) /gb=X74671 /gi=456656 /ug=Mm.1190 /len=2604
X13664:	Neuroblastoma ras oncogene	/cds=(217,798) /gb=X13664 /gi=53447 /ug=Mm.734 /len=3026 /NOTE=replacement for probe set(s) 101411_at on MG-U74A
J02995:	Abelson murine leukemia oncogene	/cds=(3565,4056) /gb=J02995 /gi=191566 /ug=Mm.1318 /len=5058
M35970:	Mouse tumor metastatic process-associated protein (NM23) gene mRNA, 3' end	/cds=(0,500) /gb=M35970 /gi=200066 /ug=Mm.1260 /len=664

X12761:	Jun oncogene	/cds=(354,1358) /gb=X12761 /gi=52758 /ug=Mm.482 /len=2565
V00727:	FBJ osteosarcoma oncogene	/cds=(152,1294) /gb=V00727 /gi=50399 /ug=Mm.5043 /len=2141 /NOTE=replacement for probe set(s) 100490_at on MG-U74A
U35836:	Tumor-associated antigen 1	/cds=(10,1257) /gb=U35836 /gi=1017751 /ug=Mm.8071 /len=1338
D63850:	Mus musculus mRNA for hepatoma- derived growth factor, complete cds, strain-BALB/c	/cds=(98,2107) /gb=D63850 /gi=2558500 /ug=Mm.38268 /len=2254
D86563:	RAB4A, member RAS oncogene family	/cds=(129,770) /gb=D86563 /gi=2706877 /ug=Mm.9221 /len=1385
U27177:	Retinoblastoma-like 1 (p107)	/cds=(63,3254) /gb=U27177 /gi=1871224 /ug=Mm.2994 /len=4863
L16953:	Mouse tumor cell dnaJ-like protein 1 mRNA, complete cds	/cds=(7,1665) /gb=L16953 /gi=473846 /ug=Mm.18237 /len=1792
X67677:	Yamaguchi sarcoma viral (v-yes) oncoge- ne homolog	/cds=(602,2227) /gb=X67677 /gi=50623 /ug=Mm.4558 /len=4550
X02452:	Mouse Ki-ras cellular oncogene exon 1 from Y1 adrenal tumor cells (and joined CDS)	/cds=(11,577) /gb=X02452 /gi=52798 /ug=Mm.31530 /len=1722
U58203:	Mus musculus Lsc (lsc) oncogene mRNA, complete cds	/cds=(91,2850) /gb=U58203 /gi=1389755 /ug=Mm.3181 /len=3200
M13071:	Raf-related oncogene	/cds=(0,1313) /gb=M13071 /gi=192016 /ug=Mm.1218 /len=1589
U41465:	B-cell leukemia/lymphoma 6	/cds=(100,2223) /gb=U41465 /gi=1209719 /ug=Mm.15811 /len=2373
M26391:	Retinoblastoma 1	/cds=(98,2863) /gb=M26391 /gi=200452 /ug=Mm.304 /len=4591

- 22 -

U59758:	Mus musculus p53-variant (p53) mRNA, partial cds	/cds=(0,161) /gb=U59758 /gi=1399879 /ug=Mm.6186 /len=846
D83002:	Anaplastic lymphoma kinase	/cds=(450,5315) /gb=D83002 /gi=1864006 /ug=Mm.2536 /len=5767
AF026124:	Mus musculus schwannoma-associated protein (SAM9) mRNA, complete cds	/cds=(417,1883) /gb=AF026124 /gi=2565395 /ug=Mm.6483 /len=2246
AF086830:	Mus musculus leukemia/lymphoma related factor LRF (Lrf) mRNA, complete cds	/cds=(58,1755) /gb=AF086830 /gi=3599510 /ug=Mm.20920 /len=1793
X74855:	Zinc finger protein 51	/cds=(350,2482) /gb=X74855 /gi=488832 /ug=Mm.14812 /len=2640

Tumorantigene, die von F5 Zellen, nicht aber von allen anderen 4 getesteten Zelllinien exprimiert werden, sind:

Cluster Incl	Name	No.
M83344:	Carcinoembryonic antigen 2	/cds=(192,1619) /gb=M83344 /gi=200316 /ug=Mm.5056 /len=2043
M90397:	B-cell leukemia/lymphoma 3	/cds=UNKNOWN /gb=M90397 /gi=192146 /ug=Mm.1068 /len=1746
M87321:	Teratocarcinoma-derived growth factor	/cds=(224,739) /gb=M87321 /gi=402714 /ug=Mm.5090 /len=1976
X94322:	M.musculus mRNA for melanoma-inhibitory-activity protein	/cds=(109,501) /gb=X94322 /gi=1134852 /ug=Mm.7964 /len=580
X13945:	Lung carcinoma myc related oncogene 1	/cds=(0,1106) /gb=X13945 /gi=53287 /ug=Mm.1055 /len=3076
AB023419:	Mus musculus mRNA for mSox7, complete cds	/cds=(50,1192) /gb=AB023419 /gi=5103026 /ug=Mm.42162 /len=3266
AB025354:	Mus musculus genes for Supl15h and Sox15, partial cds	/cds=(0,168) /gb=AB025354 /gi=5103143

		/ug=Mm.29387 /len=169
M17031:	Rous sarcoma oncogene	/cds=(0,1625) /gb=M17031 /gi=201056 /ug=Mm.56953 /len=1626
M12848:	Mouse myb proto-oncogene mRNA encoding 71 kd myb protein, complete cds	/cds=(161,2071) /gb=M12848 /gi=199934 /ug=Mm.1202 /len=3310
M12731:	Neuroblastoma myc-related oncogene 1	/cds=(0,1388) /gb=M12731 /gi=199965 /ug=Mm.16469 /len=1389
X70472:	Myeloblastosis oncogene-like 2	/cds=(142,2256) /gb=X70472 /gi=312825 /ug=Mm.4594 /len=2632
M36387:	Tumor rejection antigen P1A	/cds=(271,945) /gb=M36387 /gi=202143 /ug=Mm.1297 /len=1174 (= Tumor-AG von P815)
U05245:	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	/cds=(506,5281) /gb=U05245 /gi=497638 /ug=Mm.1211 /len=7292
AJ012160:	Mus musculus ST4 oncofetal trophoblast glycoprotein gene	/cds=(328,1608) /gb=AJ012160 /gi=3805948 /ug=Mm.20864 /len=2329
U38252:	Mus musculus FX-induced thymoma transcript (FXI-T1) mRNA, complete cds	/cds=(296,1915) /gb=U38252 /gi=1389693 /ug=Mm.1645 /len=2965
X63190:	Polyomavirus enhancer activator 3	/cds=(125,1792) /gb=X63190 /gi=53627 /ug=Mm.5025 /len=2410
X14897:	FBJ osteosarcoma oncogene B	/cds=(1201,2217) /gb=X14897 /gi=50991 /ug=Mm.26091 /len=4145
AB006329:	Mus musculus mSox13 mRNA, complete cds	/cds=(48,1835) /gb=AB006329 /gi=3077735 /ug=Mm.8575 /len=3183
AF004428:	Tumor protein D52-like 1	/cds=(191,805) /gb=AF004428 /gi=2895080 /ug=Mm.7821 /len=1267
U14133:	Silver	/cds=(0,1880) /gb=U14133 /gi=887940 /ug=Mm.16756 /len=1881

- 24 -

U65091:	Melanocyte specific gene	/cds=(195,806) /gb=U65091 /gi=1854000 /ug=Mm.2390 /len=883 /NOTE=replacement for probe set(s) 104570_at on MG-U74A
AF009414:	Mus musculus SOX11 (Sox11) mRNA, complete cds	/cds=(288,1475) /gb=AF009414 /gi=2581939 /ug=Mm.6238 /len=2896
M27266:	Fyn proto-oncogene	/cds=(225,1829) /gb=M27266 /gi=193357 /ug=Mm.4848 /len=2299
U44426:	Tumor protein D52	/cds=(21,578) gb=U44426 /gi=1469925 ug=Mm.2777 /len=2033 NOTE= replace- ment for probe set(s) 97225_at on MG-U74A
U19033:	Melanoma antigen, related sequence 2	/cds=(0,992) /gb=U19033 /gi=1165173 /ug=Mm.87790 /len=993
J04103:	E26 avian leukemia oncogene 2, 3 domain	/cds=(137,1543) /gb=J04103 /gi=193193 /ug=Mm.22365 /len=1552
X67735:	MAS1 oncogene	/cds=(0,974) /gb=X67735 /gi=53011 /ug=Mm.57182 /len=975
M32484:	Placentae and embryos oncofetal gene	/cds=(106,738) /gb=M32484 /gi=200286 /ug=Mm.6923 /len=853
AB025354:	Mus musculus genes for Supl15h and Sox15, partial cds	/cds=(0,125) /gb=AB025354 /gi=5103143 /ug=Mm.29387 /len=628 /NOTE=replacement for probe set(s) 96823_at on MG-U74A
X87257:	ELK1, member of ETS oncogene family	/cds=(473,1762) /gb=X87257 /gi=836634 /ug=Mm.3064 /len=2286

Tumorantigene, die zum Teil von B16F16, CT26, K1735 oder Renca Zellen exprimiert werden, nicht aber von F9 Zelllinien exprimiert werden, sind:

- 25 -

Cluster Incl	Name	No.
D10049:	Mus musculus mRNA for melanoma antigen, complete cds, endogenous ecotropic murine leukemia provirus region	/cds=(274,2283) /gb=D10049 /gi=220431 /ug=Mm.27979 /len=2767
M61704:	Mouse embryonic alkaline phosphatase gene, complete cds	/cds=(0,1589) /gb=M61704 /gi=192976 /ug=Mm.26096 /len=1590
U57720:	Mus musculus EGF-related protein CRYPTIC mRNA, complete cds	/cds=(255,863) /gb=U57720 /gi=1848238 /ug=Mm.2531 /len=1039
X59513:	Mouse 5' end of TRP1 gene for tyrosinase-related protein-1	/cds=(185,187) /gb=X59513 /gi=54913 /ug=Mm.30438 /len=297

Hierbei handelt es sich mit Ausnahme des „Mouse embryonic alkaline phosphatase gene“ jedoch um Zelllinien-spezifische Antigene bzw. Differentiationsantigene, die für die Wirkung einer Vakzine nicht von Bedeutung sind.

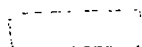
5

Somit konnte für die Embryokazinom-Zelllinie F9 nachgewiesen werden, dass nahezu alle embryonalen Antigene exprimiert werden, die als Tumorantigene verschiedener Tumortypen (z.B. Melanom-, Kolon-, Nieren- oder Bluttumoren) im Endstadium identifiziert wurden.

10

Somit wird deutlich, dass im Vergleich der verschiedenen Zelllinien die F9-Zellen die größte Anzahl an Tumorantigenen exprimieren. Dies unterstreicht die Eignung einer derartigen Zelllinie als Ausgangspunkt für die Herstellung zellulärer Vakzine für multiple Tumor-Indikationen.

15



Beispiel 2

Zelllinien, wie Hodentumor- oder embryonale Tumorzelllinien, die bereits kultiviert wurden, sind erhältlich. Eine dieser Zelllinien in der Maus ist die F9 Hoden-/embryonale Tumorzelllinie (ATCC CRL-1720). F9-Zellen wurden auf die Expression von Tumorantigenen getestet (siehe Tabelle 1).

Entsprechend Tabelle 1 wird eine Vielzahl von Tumorantigenen von einer Hoden- oder embryonale Tumorzelllinie exprimiert. In der Tabelle werden Tumorantigene, die durch andere Tumortypen wie Melanom (K1735), Nierenkarzinom (Renca), Kolonkarzinom (CT26), Brust[krebs] (CaD2), B-Zell-Plasmozytom (J558) und Granulom (Ehrlich) exprimiert werden, verglichen.

Tabelle 1

	β -Actin	TRP-1	TRP-2	gp100	Sox21	E1m1	gp70	F9	p53	CEA	Mage A1	Mart-1
F9	+++	---	---	++	+	+	+++	++	++	??	++	+/-
J558	+++	---	---	++	+	+	+++	??	+	??	++	n.d.
M3	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+	??	++	n.d.
CT26	+++	---	---	+	+	++	+++	??	+/-	??	++	---
CaD2	+++	---	---	+	+	+++	+++	??	++	??	++	+++
Renca	+++	---	---	+	+	+++	+++	??	++	??	++	++
Ehrlich	+++	---	---	+	+	+++	+++	??	+/-	??	++	(?/-)
K1735	+++	---	---	+	++	+	+++	??	++	??	---	---
B16F10	+++	++	++	++	(--)	(--)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+++
PYS	+++	---	---	+	---	---	---	(?/-)	++	---	---	---
P-19	+++	+/-	---	++	+++	++	++	+	++	---	---	---

- 27 -

	F9	Embryonales Karzinom (H2-b)
	J558	B-Zell-Plasmozytom (Balb/c, H2-d)
	M3	Mammaadenokarzinom (DBA-Mäuse)
	CT26	Kolonkarzinom (Balb/c, H2-d)
5	CaD2	Mammakarzinom
	Renca	Nierenkarzinom (Balb/c, H2-d)
	Ehrlich	Plasmozytom
	K-1735	Melanom (C3H, H2-k)
	PYS	Teratokarzinom (129, H2-b)
10	P-19	Embryonales Karzinom (C3H/He, H2-k)

Beispiel 3

Herstellung einer embryonalen Tumorzellvakzine für die Etablierung eines

15 Mausmodells

3.1 Zelllinien

Bei den Zelllinien PYS (DSMZ Nr. ACC 284, Lehman et al. (1974) J. Cell. Physiol. 84: 13-28) und P-19 (DSMZ Nr. ACC 316, McBurney et al. (1982) Develop. Biol. 89: 503-508; Rudnicki et al. (1990) Develop. Biol. 138: 348-358) handelt es sich um etablierte syngene Zelllinien der Mausstämmen C3H und 129. Diese wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; Abteilung Menschliche und Tierische Zellkulturen) erworben.

25 3.2 Plasmide

Die cDNA von GMCSF und B7.2 wurden in den Vektor pCI (Promega, Madison, WI, USA) kloniert, der einen CMV-Promotor und eine SV40 3'-untranslatierte Region zur Verfügung stellt. Für das Plasmid pAAV-mu GMCSF₂ wurden zwei Expressionskassetten – die GMCSF mit dem CMV-Promotor und der SV40-pA-site beinhalten – in Tandem in das Plasmid pAAV-Basisvektor ligiert (siehe WO 00/47757, Beispiel 4). Um die ideale Größe eine mögliche AAV-Verpackung zu

- 28 -

gewährleisten, wurden zudem weitere 400 bp aus pUC19 (bp 1516-1910) in den Vektor integriert.

Für das Plasmid **pAAV-mu B7.2-700** wurde die Expressionskassette – mit B7.2, dem CMV-Promotor und der SV40-pA-site – in das Plasmid pAAV-Basisvektor
5 ligiert. Weitere 700 bp aus pUC19 (bp 1201-1910) waren nötig, um die optimale Größe des Vektors für eine mögliche AAV-Verpackung zu erzeugen.

3.3 Transfektion der Zelllinien und Herstellung der Vakzine

10 Verschiedene Transfektionsmethoden wurden für die beiden Zelllinien getestet, wobei sich herausstellte, dass für P-19 Zellen die Calciumphosphat-Transfektion und für PYS-Zellen die Transfektion mittels Polyfect™ (Qiagen, Hilden) am besten geeignet waren. Um die Effizienz der Transfektion zu steigern, wurden die Zellen zusätzlich mit Gene-X-press™ (PAA™) behandelt.

15

a) Calciumphosphat- Transfektion von P-19 Zellen

P-19 Zellen wurden mittels PBS und Trypsin-EDTA geerntet. Die Reaktion wurde mit FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen wurden einmal gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden $1,77 \times 10^6$ P19 Zellen in eine Zell-
20 kulturflasche (175 cm²) in 22 ml Medium ausgesät (= Tag 0). Die Zellen wurden über Nacht bei befeuchteter Luft in einem Inkubator inkubiert (37°C, 5% CO₂). Am Tag 1 wurden die Zellen mittels der folgenden Materialien/Methode transfiziert:

25 Für jede Zellkulturflasche wurden 23,3 µg von **pAAV-mu B7.2-700** und 35 µg von **pAAV-mu GMCSF₂** mit 2,733 ml der CaCl₂-Lösung (270 mM, sterilfiltriert) gemischt. Anschließend wurde die selbe Menge an 2x BBS hinzu gegeben und vorsichtig gemischt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 15-20 Minuten inkubiert um das Präzipitat zu bilden. Anschließend wurden die Zellen aus dem
30 Inkubator genommen und das Gemisch vorsichtig über die Zellen verteilt. Gene-X-press (PAA, cat #: U05-006) wurde hinzu gegeben, so dass dessen Endkonzen-

- 29 -

tration 1x betrug. Dann wurden die Zellen über Nacht in einem luftbefeuchteten Inkubator inkubiert (35°C, 3% CO₂). Am nächsten Tag wurden die Zellen in einen anderen luftbefeuchteten Inkubator überführt (37°C, 5% CO₂). Das Gesamtvolumen pro Transfektionsansatz betrug 27,5 ml.

5

Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde der Überstand der Zellen abgenommen und für die Messung der GMCSF Expression aufbewahrt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsin-EDTA geerntet. Die Reaktion wurde mit FCS-haltigem vollständigen Medium gestoppt.

- 10 Ein Aliquot wurde für die Detektion der B7.2-Expression entnommen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in einer Caesiumquelle mit 100 Gy bestrahlt. Danach wurden die Zelle in FCS / 10% DMSO bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

15 **b) Transfektion der PYS Zellen mit Polyfect™**

PYS Zellen wurden mittels PBS und Trypsin-EDTA geerntet. Die Reaktion wurde mit FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen wurden einmal gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden $3,7 \times 10^6$ PYS Zellen in eine Zellkulturflasche (175 cm²) in 26,8 ml Medium ausgesät (= Tag 0). Die Zellen wurden
20 über Nacht bei befeuchteter Luft in einem Inkubator inkubiert (37°C, 5% CO₂). Am Tag 1 wurden die Zellen mittels der folgenden Materialien/Methode transfiziert.

- Für jede Zellkulturflasche wurden 1,8 ml serumfreies Medium (SFM), 23,3 µg
25 rAAV-mu B7.2 und 23,3 µg rAAV-mu GMCSF₂ gemischt, 218 µl Polyfect™ (QIAGEN, Cat # : 301107) hinzu gegeben und vorsichtig gemischt. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10,9 ml vollständiges Medium enthaltend Gene-X-press in einer Endkonzentration von 1x (=323,2 µl) hinzu gegeben, gemischt und das Gemisch auf die Zellen pipettiert.
30 Der gesamte Transfektionsansatz betrug 40 ml. Die Zellen wurden über Nacht in einem luftbefeuchteten Inkubator inkubiert (37°C, 5% CO₂).

- 30 -

Am Tag 3 wurde der Überstand der Zellen abgenommen und für die Messung der GMCSF Expression aufbewahrt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsin-EDTA geerntet. Die Reaktion wurde mit FCS-haltigem vollständigen Medium gestoppt. Ein Aliquot wurde für die Detektion der B7.2-Expression entnommen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und in einer Caesiumquelle mit 100 Gy bestrahlt. Danach wurden die Zelle in FCS / 10% DMSO bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

10

3.4 Messung der Transgenexpression (GMCSF und B7.2)

Die Zellüberstände der Transfektionsproben wurden bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt. Die Proben wurden in den Stufen 0, 1:10, 1:50, 1:250, 1:1250 verdünnt und in dem GMCSF ELISA (Pharmingen™, Cat.-Nr.: 555 167) gemäß den Instruktionen des Herstellers gemessen. Die Menge an GMCSF wurde berechnet als die Gesamtmenge sezerniert von 1×10^6 Zellen in 48 Stunden. Für optimale Bedingungen betrug die sezernierte Menge an GMCSF ca. 300-600 ng/ 1×10^6 Zellen / 48 h.

Die Zellaliquots wurden mit anti-muCD86-PE Antikörpern (Pharmingen™, Cat.-Nr. 553692) gefärbt um eine B7.2-Expression nachzuweisen. Dabei wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Die Färbereaktion fand in PBS / 5% FCS statt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in PBS / 1% Formaldehyd fixiert und bei 4°C bis zur Messung aufbewahrt. Die B7.2-Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Ein Expressionslevel $>30\%$ wurde als gut angesehen.

3.5 Herstellung der Vakzinierungszellen

Für die Herstellung der Vakzine wurden die gefrorenen Zellen im Wasserbad (37°C) aufgetaut und dreimal in PBS gewaschen. Dabei wurden die Zellen jeweils

30

- 31 -

bei 250 g für 6 Minuten abzentrifugiert und in frischem PBS resuspendiert, um das Waschmedium zu entfernen.

Anschließend wurden die Zellen in einem angemessenen Volumen PBS resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer mittels Trypan-Blau-Ausschlussfärbung gezählt. Die Zahl lebender Zellen wurde bestimmt und auf 3×10^6 Zellen pro ml eingestellt. 3×10^5 Zellen (in 100 μ l) pro Tier wurden subkutan in die Seite injiziert. Nach dieser Prozedur wurden die verbleibenden Zellsuspensionen erneut gezählt, um die Überlebensrate der Zellen innerhalb der ganzen Prozedur zu bestimmen.

Beispiel 4

Durchführung von Mausvakzinierungsexperimenten

15

Beispiel 4A) Beschreibung der Tumormodelle

Für die Untersuchung der Embryokarzinomvakzine sollen Mäuse verwendet werden. Dabei werden aufgrund der verschiedenen Tumormodelle, die untersucht werden, auch unterschiedliche Mausstämmen benötigt. Als Tumormodelle kommen folgende Zelllinien und syngenen Mausstämmen zum Einsatz:

20

Tabelle 2

Tierstamm (Maus)	MHC-Allel	Zelllinie	Tumortyp
Balb/c	H-2d	RenCa	Nierenkarzinom
Balb/c	H-2d	CT26	Kolonkarzinom
Balb/c	H-2d	J558	Plasmozytom
C3H/He	H-2k	K-1735-M2	Melanom
C57BL/6	H-2b	B16F10	Melanom

Es handelt sich dabei jeweils um syngene Inzuchtstämme, in denen der jeweilige Tumor nicht aufgrund fremder MHC-Moleküle per se abgestoßen wird. Es handelt sich um bereits etablierte und erprobte Tiermodelle für die jeweilige Tumortart.

- 5 Vakzinierung der Tiere erfolgt in allen Fällen mit der Tumorzelllinie P-19 bzw. PYS – zwei Embryokarzinomzelllinien mit unterschiedlichem MHC-Typ – als Modell für einen Embryokarzinom-Zellimpfstoff. Die Tumor-Challenge, d.h. die Injektion lebender Tumorzellen zur Induktion einer Tumorausbildung, erfolgt mit der Zelllinie des jeweiligen Tumormodells (siehe im Folgenden). Dabei kann je
10 nach Modell entweder ein prophylaktisches oder therapeutisches Vorgehen gewählt werden.

Prophylaktisch bedeutet, dass zuerst eine Immunisierung der Tiere gegen den Tumor durchgeführt wird und erst anschließend die Tumor-Challenge erfolgt.

- 15 Diese Modelle beinhalten alle eine lokale Applikation des Tumors. Das Vorhandensein und Wachstum des Tumors wird daher durch Abtasten verifiziert.

Therapeutisches Modell bedeutet, dass zuerst die Tumor-Challenge erfolgt und erst dann eine Immunisierung angeschlossen wird. Es handelt sich hierbei um ein

- 20 Tumormodell, in dem die Situation beim Tumorpatienten zu imitieren versucht wird. Auch hier liegt ein Tumor vor Beginn der Therapie vor und entsteht nicht erst nach Vakzinierung, wie das bei prophylaktischen Modellen der Fall ist. Daher entspricht das therapeutische Modell eher der Situation beim Patienten.

25 **K-1735 Tumormodell**

- Bei K-1735 handelt es sich um ein bekanntes Melanommodell im syngen Mausstamm C3H/He. Durch intravenöse Applikation von vitalen K-1735-Melanomzellen wird die Ausbildung von Lungenmetastasen provoziert. Die injizierten Zellen siedeln sich in der Endstrombahn der Lunge an und bilden kleine
30 Metastasenknötchen. Die Anzahl der Knoten entwickelt sich gegensätzlich pro-

portional zur Immunantwort der Tiere gegen das Melanom. Je stärker die Immunantwort – die v.a. durch die anschließende Vakzinierung induziert wird – ausfällt, desto weniger Lungenmetastasen wachsen an. Der Zeitpunkt der Challenge wird als „Tag 0“ bezeichnet.

5

Im Standardprotokoll erfolgt eine Vakzinierung der Tiere am Tag 4 und eine Boostung am Tag 11 nach Challenge (Zellzahl: 1×10^5). Es werden bestrahlte, nicht mehr teilungsfähige Zellen verabreicht, die noch fähig sind, immunstimulatorische Moleküle zu sezernieren, aber keinen Tumor auszubilden. Träger-

10 substanz ist physiologischer Puffer (PBS). Am Tag 21 werden die Tiere getötet und seziert. Dabei erfolgt die Entnahme der Lungen, die anschließend gewogen werden. Zudem wird die Anzahl an Metastasenknötchen in der Lunge durch Auszählung bestimmt. Dies ermöglicht ein direktes Quantifizieren des Therapieerfol-

ges.

15

Bei unbehandelten Tieren (Kontrolle) ist die Ausbildung von Lungenmetastasen am Tag 21 so weit fortgeschritten, dass deutlich Unterschiede zwischen erfolgreich behandelten und unbehandelten Tieren messbar sind, aber noch nicht so weit, dass eine erkennbare Störung des Allgemeinbefindens, bzw. -zustandes ein-

20 tritt.

Der große Vorteil dieses Modells ist die Quantifizierbarkeit des Therapieerfolges. Durch Abwiegen der Lungen und einfaches Auszählen der Lungenmetastasen an der Organoberfläche kann der Therapieerfolg quantifiziert werden. Lungen-

25 gewicht und Metastasenzahl korrelieren sehr gut, da das Gewicht der Tumormasse in das Gesamtgewicht der Lunge eingeht.

B16F10 Tumormodell

B16F10 ist ein weiteres Melanommodell, jedoch in der C57BL/6-Maus (H-2b).

30 Sie ist mit einem anderen MHC-Typ ausgestattet als die C3H-Maus (H-2k). Daher

- 34 -

verhalten sich die zwei Zelllinien zueinander allogren. Im Gegensatz zu K-1735 trägt B16F10 allerdings nur ganz geringe Mengen des Haupthistokompatibilitätskomplexes. Daher ist die Zelle deutlich weniger immunogen, da die Präsentation von Antigen gehemmt ist.

5

Die Tiere erhalten zuerst zwei Vakzinierungen mit bestrahlten Zellen (zweimal im Abstand von 2 Wochen) und erst anschließend die Challenge mit lebenden Tumorzellen (2 Wochen nach Vakzinierung). Beide werden subkutan appliziert, so dass es zur Ausbildung unter der Haut liegender, solider Tumore kommt. Diese können zur Überwachung des Tumorstwachstums abgetastet und vermessen werden. Daraus kann die Tumormasse errechnet werden, die sich umgekehrt proportional verhält zur Immunitätsausbildung des Körpers. Dafür werden die Tiere über mehrere Wochen hinweg alle 2-3 Tage klinisch auf die Tumorbildung hin untersucht. Bei Erreichen einer Tumorstgröße $\gg 1$ cm Durchmesser werden die Tiere getötet, da keine Abstoßung des Tumors mehr zu erwarten ist, aber die Gefahr einer Ulzeration der Tumorstoberfläche bzw. einer Bewegungsbeeinträchtigung der Tiere steigt. Die Zellzahl für die Tumor-Challenge beträgt 1×10^5 Zellen (in PBS).

Um vor Beginn der ersten Immunisierungsversuche die genaue Zellzahl für die Tumor-Challenge zu kennen, muss zunächst die minimale tumorigene Dosis ausgetestet werden (siehe Stufe 1).

RenCa Tumormodell

RenCa ist ein Karzinom der Niere und ist ein syngenes Modell der Balb/c-Maus. Es wurde in anderen Labors bereits sowohl als lokales Tumormodell als auch zur Induktion von Lungenmetastasen (systemische Applikation) eingesetzt. Bezüglich der Durchführung der beiden Modelle als auch hinsichtlich der Beobachtung der Tiere gilt das für B16F10 und K-1735 Gesagte (siehe dort). Die genaue Zellzahl für beide Methoden wird in Stufe 1 der Tierexperimente bestimmt.

30

CT26 Tumormodell

CT26 ist eine Zelllinie, die von einem Kolonkarzinom der Balb/c-Maus stammt. Diese Zelllinie wurde ebenfalls von anderen Labors sowohl für lokale als auch systemische Tumormodelle mit Ausbildung von Lungenmetastasen verwendet.

- 5 Für das Vorgehen gilt dasselbe wie für Renca (siehe dort). Die minimale tumorigene Dosis für die Tumor-Challenge wird ebenfalls in Stufe 1 bestimmt.

J558 Tumormodell

- Bei J558 handelt es sich um ein Plasmazytom, also einen B-Zell-Tumor der Balb/c-Maus. Als Modell für eine Tumorthherapie fungiert folgender Versuchsaufbau: Die Tiere erhalten am Tag 0 eine subkutane Injektion mit lebenden J558-Tumorzellen. Diese formen einen soliden subkutanen Tumor, der mühelos palpiert und vermessen werden kann. Die Vakzinierung erfolgt am Tag 4 und 11. Die minimale tumorigene Dosis muss hier ebenfalls zuerst in Stufe 1 des Versuchsplanes genau bestimmt werden.
- 10
15

Vakzine

- Die Vakzine, die bei allen Tumormodellen zur Anwendung kommt, sind die zwei Zelllinien P-19 und PYS. Es handelt sich dabei um zwei verschiedene Embryokarzinomzelllinien, die aus verschiedenen Mausstämmen stammen und sich daher im MHC-Typ unterscheiden. Zudem ist die Menge spezifischer Tumorantigene verschieden groß. Während P-19 eine recht große Anzahl Tumorantigene verschiedenster Tumormodelle exprimiert, ist die Menge bei PYS deutlich geringer. Im Falle des Melanoms K-1735 kann P-19 aufgrund des gleichen MHC-Typs sogar als „autologe“ Vakzine eingesetzt werden (= entspricht Vakzinezellen, die aus dem gleichen Patienten stammen, bzw. Patient und Vakzine tragen keine sich unterscheidenden MHC-Allele). Hier kann der Unterschied autolog zu allogenen untersucht werden, d.h. der Einfluss fremder MHC-Allele auf die Ausbildung einer Immunität bei einer Embryokarzinomvakzine. Zur Verstärkung der Wirksamkeit wird in einigen Versuchen zusätzlich ein Adjuvans eingesetzt, das zusammen mit den Zellen appliziert wird.
- 20
25
30

Beispiel 4B) Angaben zur praktischen Durchführung**Applikation von Tumorzellen / Tumorinduktion („Challenge“):**

Unter Challenge versteht man die Applikation lebender Tumorzellen an die Tiere.

- 5 Bei naiven Tieren führt die Applikation einer Challenge mit einer Zellzahl, die über der minimalen tumorigenen Dosis (MTD, siehe Versuchsteil) liegt, abhängig von der Applikationsroute zur Ausbildung eines lokalen oder systemischen Tumorstadiums. Damit wird das Immunsystem „herausgefordert“ (= Challenge), die Tumorzellen im optimalen Falle – d.h. bei vorhandener oder entstehender
- 10 Immunität – ganz abzuwehren.

Lokale Tumore:

Zur Induktion lokaler Tumore werden den Tieren lebende Tumorzellen (K-1735, B16F10, RenCa, CT26, J558) in vorher bestimmter Zellzahl (siehe Versuchsteil

- 15 Stufe 1: MTD) subkutan in die Flanke injiziert. Die Tumorzellen bilden bei fehlender Immunität der Tiere einen soliden subkutanen Tumor aus. Der Tumor stellt für die Tiere keine besondere Beeinträchtigung dar, solange es zu keiner Ulzeration der Tumoroberfläche oder einer Bewegungseinschränkung der Tiere durch zu großes Tumorstadium kommt. Übersteigt der Tumor eine Größe von >1 cm
- 20 Durchmesser, werden die Tiere getötet. Dadurch wird das Tumor-Endstadium mit starker Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens vermieden.

Die subkutane Injektion erfolgt aufgrund der Kürze des Eingriffs und der geringen Belastung der Tiere ohne Narkose. Die Applikation der Zellen erfolgt in physiologischer gepufferter Kochsalzlösung („PBS“) in einem Volumen von 0,1 ml bis

25 maximal 0,2 ml.

Lungenmetastasen:

In einigen Modellen ist auch die Induktion von Lungenmetastasen möglich (K-1735, CT26, RenCa). Dazu werden lebende Tumorzellen in vorher bestimmter Zellzahl (siehe Versuchsteil Stufe 1: MTD) intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Zellen erreichen über das Herz die Lunge und damit die erste Endstrombahn im Körper. Hier lagern sich die Tumorzellen an und bilden kleine Metastasenknotten aus. Die Tötung der Tiere erfolgt zu einem Zeitpunkt, zu dem die Metastasen eine makroskopisch erkennbare Größe (ca. 0,5-1,5 mm) erreicht haben, aber bevor die Metastasen die Lungenfunktion deutlich beeinträchtigen (in der Regel ca. Tag 21).

Um eine möglichst optimale Applikation ohne starke Beeinträchtigung der Tiere z.B. durch manuelle Fixation zu erreichen, werden die Tiere in eine Fixationskammer verbracht. Dies wird von den Tieren in der Regel sehr gut toleriert. Die intravenöse Injektion erfolgt aufgrund der Kürze des Eingriffs und der relativ geringen Belastung der Tiere ohne Narkose. Die Applikation der Zellen erfolgt in physiologischer gepufferter Kochsalzlösung in einem Volumen von 0,2 ml („PBS“).

20 Vakzinierung

Die Vakzinierung der Tiere erfolgt mit bestrahlten Tumorzellen (z.T. genetisch modifiziert, siehe Versuchsteil). Diese werden in physiologischer gepufferter Kochsalzlösung (PBS) in einem Volumen von 0,1 ml subkutan in die Flanke appliziert. Der Zeitpunkt für die Vakzinierung ist vom Modell und vom Vakzinierungsschema abhängig. Bei einer prophylaktischen Vakzinierung erfolgt die Immunisierung der Tiere vor Applikation der Challenge. Applikationszeitpunkt ist 4 und 2 Wochen vor der Challenge. Die Vakzine wird bei lokalen Tumormodellen immer auf die Gegenüberliegende Seite gesetzt, auf der die Challenge erfolgt. Dadurch wird erreicht, dass nur bei systemischer Wirksamkeit der Vakzine eine

Tumorabstoßung eintritt und nicht aufgrund lokaler Immunreaktionen. Bei einer therapeutischen Vakzinierung erfolgt die Immunisierung der Tiere nach der Challenge. Vakzinierungszeitpunkt ist Tag 4 und 11 nach der Challenge. Die subkutane Injektion erfolgt hier ebenfalls aufgrund der Kürze des Eingriffs und
5 der relativ geringen Belastung der Tiere ohne Narkose. Bei einigen Versuchen wird zusätzlich ein Adjuvans eingesetzt, das zusammen mit den Tumorzellen appliziert wird und keine Nebenwirkungen bzw. zusätzlichen Belastungen hervorruft.

10 Beobachtung / klinische Untersuchung der Tiere

Alle ein bis drei Tage v.a. bei Tumormodellen mit lokalen Tumoren werden die Tiere adspektorisch und auch auch palpatorisch untersucht. Hierbei wird die Entwicklung des Tumorwachstums durch Ausmessen der Tumorgroße bestimmt.

Bei Tumormodellen mit Induktion von Lungenmetastasen werden die Tiere hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens untersucht, um Beeinträchtigungen durch das
15 Tumorwachstum rechtzeitig erkennen zu können. Relevante Parameter sind der allgemeine Zustand der Tiere, Futter- und Wasseraufnahme, evtl. Abmagerung, gestörte Atmung oder sonstige Beeinträchtigungen. Bei deutlich gestörtem Allgemeinbefinden werden die Tiere aus Tierschutzgründen auch vor dem regulären
20 Versuchsende getötet.

Tötung der Tiere

Die Tötung aller Tiere erfolgt durch Genickbruch (gemäß EU-Empfehlung). Die Tiere werden bei Versuchen mit Lungenmetastasen-Bildung an Tag 21 nach
25 Challenge getötet und anschließend seziiert. Dabei wird das Lungengewicht, die Anzahl an Metastasenknötchen, sowie sonstige Abweichungen vom Normalzustand erfaßt. Bei Bedarf werden – erst nach erfolgter Tötung der Tiere – Blut oder Organe (z.B. Milz für immunologische Untersuchungen) entnommen. Durch die

genaue Bestimmung von Lungengewicht und Metastasenzahl ist der Therapieerfolg direkt zahlenmäßig quantifizierbar.

5 In Versuchen mit lokaler Tumorbildung werden die Tiere nicht zu einem definierten Zeitpunkt getötet, sondern individuell abhängig von der Ausbildung eines Tumors. Die Tötung erfolgt bei Überschreiten einer Tumorgroße von ca. 1 cm Durchmesser, ab der keine Abstoßung des Tumors mehr zu erwarten ist. Vielmehr ist bei Größerwerden des Tumors mit einer Beeinträchtigung der Tiere zu rechnen, die vermieden werden soll.

10

Beispiel 4C) Versuchsplanung

Stufe 1: Tumorigenitätstest der einzelnen Tumorzelllinien bei lokaler Applikation: Minimale tumorigene Dosis (MTD) (Versuch Nr. 1.1)

15 Für die folgenden Versuche in den verschiedenen Tumormodellen muss die Zellzahl bekannt sein, die bei Applikation ohne vorherige Immunität gegen den Tumor sicher zu einer Tumorausbildung führt. Es soll dabei eine Zellzahl gewählt werden, die eine sichere Entstehung von Tumoren bei Kontrolltieren ermöglicht, aber nicht zu hoch ist, um vom Immunsystem – im Falle einer Immunitäts-
20 ausbildung – noch abgestoßen werden zu können.

Die minimale tumorigene Dosis (MTD), ist die Zellzahl, die mindestens nötig ist, um bei einer Gruppe naiver Tiere, bei allen Tieren einen Tumor hervorzurufen. Für Vakzinierungsversuche wird meistens eine Zellzahl gewählt, die geringfügig
25 darüber liegt. Um eine sichere Tumorausbildung bei den Kontrolltieren zu gewährleisten. Dies gilt sowohl für lokale Tumormodelle, bei denen Tumore subkutan induziert werden, als auch systemischen Modellen mit Ausbildung von Lungenmetastasen. Letztere haben den Vorteil, auch die immunologische Wirkung gegen disseminierte Metastasenherde einzuschließen.

Die Tiere erhalten eine subkutane Injektion mit der angegebenen Zellzahl der jeweiligen Zelllinie in die Flanke (siehe Tabelle). Anschließend werden die Tiere alle 2-3 Tage untersucht und abgetastet, um entstehende Tumorknötchen baldmöglichst festzustellen. Die Größenentwicklung der Tumore wird mittels einer Schieblehre ausgemessen und das Tumolvolumen errechnet. Bei Erreichen einer Tumorgöße von 1-1,5 cm Durchmesser ist mit keiner Abstoßung mehr zu rechnen, weshalb die Tiere dann getötet werden. Die minimale tumorigene Dosis (MTD) ist die niedrigste Zellzahl, die bei allen Tieren der Gruppe ein Tumorstadium induziert.

Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

- a) Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen
- 15 Modell: RENCA
- b) Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen
- Modell: CT26
- c) Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen
- Modell: J558
- 20 Gesamtdauer: etwa 4 Wochen

Gruppe	Challenge mit	Zellzahl	Anzahl Tiere
1	RenCa	3×10^6	5
2	--,,--	1×10^6	5
3	--,,--	3×10^5	5
4	--,,--	1×10^5	5
5	--,,--	3×10^4	5
6	CT26	3×10^6	5
7	--,,--	1×10^6	5
8	--,,--	3×10^5	5
9	--,,--	1×10^5	5

- 41 -

10	--,"--	3×10^4	5
11	J558	5×10^6	5
12	--,"--	3×10^6	5
13	--,"--	1×10^6	5
14	--,"--	3×10^5	5
15	--,"--	1×10^5	5
		Gesamt:	75

**Tumorigenitätstest von Renca und CT26 bei systemischer Applikation:
Minimale tumorigene Dosis im Lungenmetastasenmodell (MTD) (Versuch
5 1.2):**

Für die Modelle Renca und CT26 existieren auch Protokolle für die systemische Applikation in die Schwanzvene, was durch Ansiedlung der injizierten Zellen in der Lunge zur Induktion von Lungenmetastasen führt (Yoon SS et al. (1999) Cancer Research, 59: 6251-6256, Casares N et. al. (2001) Eur J Immunol; 31: 1780-
10 1789). Um die optimale Zellzahl (=Minimale tumorigene Dosis) für dieses Vorgehen zu bestimmen, soll auch hier ein Vortest durchgeführt werden.

Die Tiere erhalten eine intravenöse Injektion mit verschiedenen Zellzahlen (siehe Tabelle) der zwei Zelllinien. Anschließend werden die Tiere alle 1-2 Tage beobachtet, ob Störungen des Allgemeinbefindens auftreten: z.B. gestörte Atmung, Abmagerung, etc. Sollte das der Fall sein werden die Tiere der betreffenden Gruppe auch vorzeitig getötet. Am Tag 21 nach Applikation der Tumorzellen werden alle Tiere seziert und die Lungen zur Quantifizierung der Tumorlast gewogen. Eine Gruppe Tiere ohne Injektion dient dabei als Negativkontrolle zur
15 Bestimmung des reinen Lungengewichts. Anschließend wird noch die Anzahl an Lungenmetastasen auf der Lungenoberfläche bestimmt und zum Lungengewicht in Relation gesetzt. Die Zellzahl, die zu mittleren Zahlen an Lungenmetastasen führen, also eine Variation der Zahl nach oben und unten (als Zeichen eines therapeutischen Effekts) zulassen, wird als Tumordosis für anschließende Experimente
20 definiert.
25

- 42 -

Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

a) Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

5 Modell: RENCA

b) Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

Modell: CT26

Gesamtdauer: etwa 4 Wochen

Gruppe	Challenge (i.v.) mit	Zellzahl	Anzahl Tiere
1	RENCA	3×10^5	5
2	--,,--	1×10^5	5
3	--,,--	3×10^4	5
4	--,,--	1×10^4	5
5	CT26	1×10^6	5
6	--,,--	3×10^5	5
7	--,,--	1×10^5	5
8	--,,--	3×10^4	5
9	Keine Challenge	---	5
		Gesamt:	45

10

Stufe 2: Prophylaktische Vakzinierung mit transgenen Embryokarzinomzellen in verschiedenen Tumormodellen

In diesem Teil des Versuchs soll in einigen der Tumormodelle die Wirkung einer prophylaktischen Immunisierung mit gentechnisch manipulierten Embryokarzinomzellen untersucht werden. Kann mittels der Transgene B7.2 und GMCSF bzw. RANTES eine Immunität gegenüber Tumorantigenen induziert werden, die zur Abstoßung anschließend verabreichter, lebender Tumorzellen führt?

15

Prophylaktische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen im Melanommodell (B16F10) (Versuch Nr. 2.1)

Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen lokale Tumore des Melanoms B16F10 untersucht werden. Die Tiere erhalten am Tag 0 und 14 eine
 5 Vakzine mit bestrahlten P-19 oder PYS-Vakzinezellen (3×10^5 Zellen), die mit verschiedenen Transgenen (B7.2-GMCSF oder B7.2-RANTES) transfiziert wurden. Als Transgenkontrolle werden jeweils Zellen ohne Transgen mitgeführt. Als Kontrolle für die Immunitätslage der Tiere wird jeweils eine Gruppe mit autologen Zellen (B16F10) vakziniert, die ebenfalls die beiden Transgenkombinationen
 10 tragen. Eine Pufferkontrolle („PBS“) dient zur Kontrolle des Einflusses, den die Manipulation der Tiere ausübt. Am Tag 28 wird den Tieren zur Induktion von Tumorwachstum eine subkutane Challenge (1×10^5 B16F10) in die Flanke verabreicht, auf die gegenüberliegende Seite der Challenge. Anschließend werden die Tiere über mehrere Wochen hinweg regelmäßig hinsichtlich Tumorwachstum
 15 untersucht.

Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

Tiere: C57BL/6, weiblich, 6-7 Wochen

20 Modell: B16F10

Gesamtdauer: etwa 3 Monate

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	20
2	0 und 14	B16F10-B7.2-GMCSF (Kontrolle)	20
3	0 und 14	B16F10-B7.2-Rantes (Kontrolle)	20
4	0 und 14	P-19-wt	20
5	0 und 14	P-19-B7.2-GMCSF	20
6	0 und 14	P-19-B7.2-Rantes	20
7	0 und 14	PYS-wt	20
8	0 und 14	PYS-B7.2-GMCSF	20
9	0 und 14	PYS-B7.2-Rantes	20
Gesamt:			180

- 44 -

Prophylaktische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen im lokalen Nierenkarzinommodell (RenCa) (Versuch Nr. 2.2)

Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen lokale Tumore des Nierenkarzinoms Renca untersucht werden. Das Vorgehen entspricht genau dem in Versuch Nr. 2.1. beschriebenen. Als autologe Kontrolle dienen allerdings trans-

5 fizierte RenCa Zellen (RenCa-B7.2-GMCSF, bzw. -B7.2-RANTES). Die Zellzahl der Challenge (RenCa) richtet sich nach den Ergebnissen der MTD-Studie (siehe Versuch 1.1).

10 Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

Modell: RenCa

Gesamtdauer: etwa 3 Monate

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	20
2	0 und 14	RenCa-B7.2-GMCSF (Kontrolle)	20
3	0 und 14	RenCa-B7.2-Rantes (Kontrolle)	20
4	0 und 14	P-19-wt	20
5	0 und 14	P-19-B7.2-GMCSF	20
6	0 und 14	P-19-B7.2-Rantes	20
7	0 und 14	PYS-wt	20
8	0 und 14	PYS-B7.2-GMCSF	20
9	0 und 14	PYS-B7.2-Rantes	20
Gesamt:			180

15

Prophylaktische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen im Kolonkarzinommodell (CT26) (Versuch Nr. 2.3)

Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen lokale Tumore des Kolonkarzinoms CT26 untersucht werden. Das Vorgehen entspricht genau dem in Versuch Nr. 2.1. beschriebenen. Als autologe Kontrolle dienen allerdings trans-

20 fierte CT26 Zellen (CT26-B7.2-GMCSF, bzw. -B7.2-RANTES). Die Zellzahl der

Challenge (CT26) richtet sich nach den Ergebnissen der MTD-Studie (siehe Versuch 1.1).

Versuchsaufbau:

5 Tiere und Modell:

Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

Modell: CT26

Gesamtdauer: etwa 3 Monate

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	20
2	0 und 14	CT26-B7.2-GMCSF (Kontrolle)	20
3	0 und 14	CT26-B7.2-Rantes (Kontrolle)	20
4	0 und 14	P-19-wt	20
5	0 und 14	P-19-B7.2-GMCSF	20
6	0 und 14	P-19-B7.2-Rantes	20
7	0 und 14	PYS-wt	20
8	0 und 14	PYS-B7.2-GMCSF	20
9	0 und 14	PYS-B7.2-Rantes	20
		Gesamt:	180

10

Prophylaktische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen im Plasmozytommodell (J558) (Versuch Nr. 2.4)

Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen lokale Tumore des Plasmozytoms J558 untersucht werden. Das Vorgehen entspricht genau dem in

15 Versuch Nr. 2.1. beschrieben. Als autologe Kontrolle dienen allerdings transfizierte J558 Zellen (J558-B7.2-GMCSF, bzw. -B7.2-RANTES). Die Zellzahl der Challenge (J558) richtet sich nach den Ergebnissen der MTD-Studie (siehe Versuch 1.1).

20 Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

Modell: J558

Gesamtdauer: etwa 3 Monate

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	20
2	0 und 14	J558-B7.2-GMCSF (Kontrolle)	20
3	0 und 14	J558-B7.2-Rantes (Kontrolle)	20
4	0 und 14	P-19-wt	20
5	0 und 14	P-19-B7.2-GMCSF	20
6	0 und 14	P-19-B7.2-Rantes	20
7	0 und 14	PYS-wt	20
8	0 und 14	PYS-B7.2-GMCSF	20
9	0 und 14	PYS-B7.2-Rantes	20
		Gesamt:	180

Stufe 3: Therapeutische Vakzinierung mit transgenen Embryokarzinomzellen in verschiedenen Tumormodellen

In diesem Teil des Versuchsantrages soll in einigen der Tumormodelle die Wirkung einer therapeutischen Immunisierung mit gentechnisch manipulierten Embryokarzinomzellen untersucht werden. Für die Modelle K-1735, Renca und CT26 existieren etablierte Protokolle für die Induktion von Lungenmetastasen, die anschließend durch Immunisierung therapiert werden können. Damit kommt das Modell der Situation im Patienten nahe, wo auch lediglich eine therapeutische Intervention und keine prophylaktische möglich ist. Zudem hat das Lungenmetastasenmodell den Vorteil auch den Aspekt der Immunität gegen im Körper verteilte Metastasen testen zu können. Hierbei ist eine generalisierte Immunität notwendig.

Therapeutische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen im Lungenmetastasenmodell des Melanoms (Versuch Nr. 3.1)

Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen Lungenmetastasen des Melanoms K-1735 untersucht werden. Die Tiere erhalten am Tag 0 eine Challenge mit 1×10^5 K-1735-Zellen intravenös in die Schwanzvene. Am Tag 4 und 11 erfolgt die Vakzinierung mit bestrahlten P-19 oder PYS-Vakzinezellen (3×10^5 Zellen, subkutan), die mit verschiedenen Transgenen (B7.2-GMCSF oder B7.2-RANTES) transfiziert wurden. Als Transgenkontrolle werden jeweils Zellen ohne

- 47 -

- Transgen mitgeführt. Als Kontrolle für die Immunitätslage der Tiere wird jeweils eine Gruppe mit autologen Zellen (K-1735) vakziniert, die ebenfalls die beiden Transgenkombinationen tragen. Eine Pufferkontrolle („PBS“) dient zur Kontrolle des Einflusses, den die Manipulation der Tiere ausübt. Am Tag 21 werden alle
- 5 Tiere seziert, die Lungen entnommen zur Bestimmung von Lungengewicht und -metastasenzahl.

Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

- 10 Tiere: C3H/He, weiblich, 6-7 Wochen
- Modell: K-1735-M2
- Gesamtdauer: etwa 5 Wochen (inkl. Adaptation)

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	20
2	0 und 14	K-1735-B7.2-GMCSF (Kontrolle)	20
3	0 und 14	K-1735-B7.2-Rantes (Kontrolle)	20
4	0 und 14	P-19-wt	20
5	0 und 14	P-19-B7.2-GMCSF	20
6	0 und 14	P-19-B7.2-Rantes	20
7	0 und 14	PYS-wt	20
8	0 und 14	PYS-B7.2-GMCSF	20
9	0 und 14	PYS-B7.2-Rantes	20
		Gesamt:	180

- Therapeutische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen im Lungenmetastasenmodell des Nierenkarzinoms (Versuch Nr. 3.2)**
- 15 Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen Lungenmetastasen des Nierenkarzinoms RenCa untersucht werden. Das Vorgehen entspricht genau dem in Versuch Nr. 3.1. beschriebenen. Als autologe Kontrolle dienen allerdings trans-
- 20 fizierte RenCa Zellen (RenCa-B7.2-GMCSF, bzw. -B7.2-RANTES). Die Zellzahl der Challenge (RenCa) richtet sich nach den Ergebnissen der MTD-Studie (siehe Versuch 1.2).

- 48 -

- In den Versuchen 3.2 und 3.3 sollen zusätzlich zu den aufgeführten Versuchstieren noch 6 Indikatortiere mitgeführt werden. Diese erhalten lediglich eine Challenge und keine Vakzinierung und dienen der Feststellung des optimalen Sektionszeitpunktes. Da mit diesen beiden Modellen bisher keine Erfahrungen vorliegen, sichert das die Sektion zum richtigen Zeitpunkt ab. Da keine Immunisierung erfolgt, kann davon ausgegangen werden, dass bei diesen Tieren die größte Zahl an Metastasen auftritt. Es sollen 3 Tage vor, sowie am Tag der geplanten Sektion je 3 Tiere getötet werden, um festzustellen, ob die Metastasierung bereits für eine Auswertung ausreicht. Ist das der Fall, soll die Sektion vorgezogen werden. Ist das nicht der Fall, erfolgt die Sektion je nach Befund der zweiten Gruppe Indikatortiere am Tag der geplanten Sektion, oder wird erneut um einige Tage nach hinten geschoben. Dies dient dazu, die Tiere nicht zu früh zu töten, wenn noch keine Aussage getroffen werden kann, bzw. eine zu starke Metastasierung zu vermeiden.

Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

20 Modell: Renca

Gesamtdauer: etwa 5 Wochen (inkl. Adaptation)

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	20
2	0 und 14	RenCa-GMCSF (Kontrolle)	20
3	0 und 14	RenCa-B7.2-Rantes (Kontrolle)	20
4	0 und 14	P-19-wt	20
5	0 und 14	P-19-B7.2-GMCSF	20
6	0 und 14	P-19-B7.2-Rantes	20
7	0 und 14	PYS-wt	20
8	0 und 14	PYS-B7.2-GMCSF	20
9	0 und 14	PYS-B7.2-Rantes	20
---	---	Indikatortiere	6
Gesamt:			186

Um diesen Versuch durchführen zu können, ist eine gute Bildung von Metastasen in der Lunge – und nur dort – Voraussetzung für die Auswertbarkeit der Ergebnisse. Daher muss wie zuvor beschrieben, die Anzahl nötiger Zellen für die Challenge in Versuch 1.2 bestimmt werden. Statt dessen kann der Versuch auch im lokalen Tumormodell durchgeführt werden. Die Versuchsgruppen ändern sich nicht, lediglich die Behandlung der Tiere: In diesem Falle erfolgt die Challenge subkutan in die Flanke statt intravenös. Die anschließende, therapeutische Vakzinierung erfolgt wie beim Lungenmetastasenmodell. Die Tiere werden jedoch anschließend regelmäßig zur Erfassung entstehender lokaler Tumore untersucht (vgl. Versuche in Stufe 2) und bei Erreichen einer Tumorgroße > 1 cm getötet.

Therapeutische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen im Lungenmetastasenmodell des Kolonkarzinoms (Versuch Nr. 3.3)

Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen Lungenmetastasen des Kolonkarzinoms CT26 untersucht werden. Das Vorgehen entspricht genau dem in Versuch Nr. 3.1. beschriebenen. Als autologe Kontrolle dienen allerdings transfizierte CT26 Zellen (CT26-B7.2-GMCSF, bzw. -B7.2-RANTES). Die Zellzahl der Challenge (CT26) richtet sich nach den Ergebnissen der MTD-Studie (siehe Versuch 1.2). In diesem Versuch sollen ebenfalls Indikatortiere zur Absicherung des richtigen Sektionszeitpunktes eingesetzt werden (siehe unter 3.2).

Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

25 Modell: CT26

Gesamtdauer: etwa 5 Wochen (inkl. Adaptation)

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	20
2	0 und 14	RenCa-GMCSF (Kontrolle)	20
3	0 und 14	RenCa-B7.2-Rantes (Kontrolle)	20
4	0 und 14	P-19-wt	20
5	0 und 14	P-19-B7.2-GMCSF	20

- 50 -

6	0 und 14	P-19-B7.2-Rantes	20
7	0 und 14	PYS-wt	20
8	0 und 14	PYS-B7.2-GMCSF	20
9	0 und 14	PYS-B7.2-Rantes	20
---	---	Indikatortiere	6
		Gesamt:	186

Um diesen Versuch durchführen zu können, ist eine gute Bildung von Metastasen in der Lunge – und nur dort – Voraussetzung für die Auswertbarkeit der Ergebnisse. Daher muss wie zuvor beschrieben, die Anzahl nötiger Zellen für die Challenge in Versuch 1.2 bestimmt werden. Statt dessen kann der Versuch auch im lokalen Tumormodell durchgeführt werden. Die Versuchsgruppen ändern sich nicht, lediglich die Behandlung der Tiere: In diesem Falle erfolgt die Challenge subkutan in die Flanke statt intravenös. Die anschließende, therapeutische Vakzinierung erfolgt wie beim Lungenmetastasenmodell. Die Tiere werden jedoch anschließend regelmäßig zur Erfassung entstehender lokaler Tumore untersucht (vgl. Versuche in Stufe 2) und bei Erreichen einer Tumorgroße > 1 cm getötet.

Therapeutische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen im Lungenmetastasenmodell des Plasmozytoms (Versuch Nr. 3.4)

Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen lokale Tumore des Plasmozytoms J558 untersucht werden. Da es für J558 kein Lungenmetastasenmodell gibt, wird hier auf die therapeutische Vakzinierung gegen lokale Tumore zurückgegriffen. Dafür erhalten die Tiere am Tag 0 eine Challenge mit vorher bestimmter Zellzahl (siehe Versuch 1.1) J558-Zellen subkutan in die Flanke. Am Tag 4 und 11 erfolgt die Vakzinierung mit bestrahlten P-19 oder PYS-Vakzinenzellen (3×10^5 Zellen, subkutan), bzw. mit den Kontrollen. Danach werden die Tiere über mehrere Wochen hinweg hinsichtlich Tumorwachstum untersucht und entstehende Tumor vermessen. Als autologe Kontrolle dienen in diesem Fall transfizierte J558 Zellen (J558-B7.2-GMCSF, bzw. -B7.2-RANTES).

Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

Modell: J558

5 Gesamtdauer: etwa 3 Monate (inkl. Adaptation)

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Anzahl Tiere
1	4 und 11	PBS (Kontrolle)	20
2	4 und 11	J558-GMCSF (Kontrolle)	20
3	4 und 11	J558-B7.2-Rantes (Kontrolle)	20
4	4 und 11	P-19-wt	20
5	4 und 11	P-19-B7.2-GMCSF	20
6	4 und 11	P-19-B7.2-Rantes	20
7	4 und 11	PYS-wt	20
8	4 und 11	PYS-B7.2-GMCSF	20
9	4 und 11	PYS-B7.2-Rantes	20
		Gesamt:	180

10 **Stufe 4: Therapeutische Vakzinierung mit transgenen Embryokarzinomzellen zusammen mit einem Adjuvans in verschiedenen Tumormodellen:**

In diesem Teil des Versuchsantrages soll die zusätzliche Wirkung eines Adjuvans im Zusammenhang mit einer Embryokarzinomvakzine untersucht werden. Dies soll wieder im therapeutischen Modell geschehen, da hier die Auswirkungen am deutlichsten zu untersuchen sind. Hier kann die Potenz einer solchen kombinierten Vakzine am besten getestet werden, da das Modell der Situation des Patienten am nächsten kommt. Zusätzlich soll hier ein Adjuvans zum Einsatz kommen.

20 **Therapeutische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen und Adjuvans im Lungenmetastasenmodell des Melanoms (Versuch Nr. 4.1)**

Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen Lungenmetastasen des Melanoms K-1735 untersucht werden. Das Vorgehen entspricht dem in Versuch 3.1. Einzige Änderung ist die Applikation des Adjuvans zusammen mit der Vak-

- 52 -

zine in einer Spritze. Daher ändert sich die Behandlung der Tiere nicht. Als Vakzine wird die Embryokarzinomzelllinie eingesetzt, die sich in Versuch 3.1. als optimal herausgestellt hat.

5 Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

Tiere: C3H/He, weiblich, 6-7 Wochen

Modell: K-1735-M2

Gesamtdauer: etwa 5 Wochen (inkl. Adaptation)

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Adjuvans	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	---	20
2	0 und 14	PBS (Kontrolle)	ja	20
3	0 und 14	EmbryoCa-wt	---	20
4	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-GMCSF	---	20
5	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-Rantes	---	20
6	0 und 14	EmbryoCa-wt	ja	20
7	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-GMCSF	ja	20
8	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-Rantes	ja	20
			Gesamt:	166

10

Therapeutische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen und Adjuvans im Lungenmetastasenmodell des Nierenkarzinoms (Versuch Nr. 4.2)

Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen Lungenmetastasen des Nierenkarzinoms RenCa untersucht werden. Das Vorgehen entspricht dem in Versuch 3.2. Einzige Änderung ist die Applikation des Adjuvans zusammen mit der Vakzine in einer Spritze. Daher ändert sich die Behandlung der Tiere nicht. Als Vakzine wird die Embryokarzinomzelllinie eingesetzt, die sich in Versuch 3.2. als optimal herausgestellt hat. Hier werden ebenfalls Indikatortiere mitgeführt (vgl. Versuch 3.2).

20

- 53 -

Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

Modell: RenCa

5 Gesamtdauer: etwa 5 Wochen (inkl. Adaptation)

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Adjuvans	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	---	20
2	0 und 14	PBS (Kontrolle)	ja	20
3	0 und 14	EmbryoCa-wt	---	20
4	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-GMCSF	---	20
5	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-Rantes	---	20
6	0 und 14	EmbryoCa-wt	ja	20
7	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-GMCSF	ja	20
8	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-Rantes	ja	20
---	---	Indikatortiere	---	6
			Gesamt:	166

Therapeutische Vakzinierung mit Embryokarzinomzellen und Adjuvans im Lungenmetastasenmodell des Kolonkarzinoms (Versuch Nr. 4.3)

- 10 Hierbei soll die Wirkung der Embryokarzinomzellen gegen Lungenmetastasen des Kolonkarzinoms CT26 untersucht werden. Das Vorgehen entspricht dem in Versuch 3.3. Einzige Änderung ist die Applikation des Adjuvans zusammen mit der Vakzine in einer Spritze. Daher ändert sich die Behandlung der Tiere nicht. Als Vakzine wird die Embryokarzinomzelllinie eingesetzt, die sich in Versuch 3.3. als
- 15 optimal herausgestellt hat. Hier werden ebenfalls Indikatortiere mitgeführt (vgl. Versuch 3.2).

- 54 -

Versuchsaufbau:

Tiere und Modell:

Tiere: Balb/c, weiblich, 6-7 Wochen

Modell: CT26

5 Gesamtdauer: etwa 5 Wochen (inkl. Adaptation)

Gruppe	Vakzinierung an Tag	Vakzine	Adjuvans	Anzahl Tiere
1	0 und 14	PBS (Kontrolle)	---	20
2	0 und 14	PBS (Kontrolle)	ja	20
3	0 und 14	EmbryoCa-wt	---	20
4	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-GMCSF	---	20
5	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-Rantes	---	20
6	0 und 14	EmbryoCa-wt	ja	20
7	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-GMCSF	ja	20
8	0 und 14	EmbryoCa -B7.2-Rantes	ja	20
---	---	Indikatortiere	---	6
			Gesamt:	160

Patentansprüche

1. Verwendung einer technisch veränderten Zelle zur Herstellung einer Vakzine
5 zur Behandlung oder Vorbeugung einer Tumorerkrankung, wobei die technisch veränderte Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die technisch veränderte Zelle mehrere
10 Tumorantigene exprimiert, vorzugsweise embryonale Tumorantigene, insbesondere mindestens 4, vor allem mindestens 10, aus der Gruppe enthaltend Ny-ESO-1, CEA1, CEA2, CEA3, α -feto Protein, MAGE X2, BAGE, GAGE1, GAGE2, GAGE3, GAGE4, GAGE5, GAGE6, GAGE7, GAGE7a, GAGE8, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12, MAGE1, MAGE2, MAGE3, MAGE3b, MAGE4a,
15 MAGE4b, MAGE5, MAGE5a, MAGE5b, MAGE6, MAGE7, MAGE8, MAGE9, PAGE1, PAGE4, CAMEL, PRAME, LAGE1, gp100 und p53.
3. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die technisch veränderte Zelle eine Tumorzelle, vorzugsweise ein Hodentumorzelle oder eine embryonale Tumorzelle ist.
- 20 4. Verwendung nach Anspruch 1 bis 2, wobei die technisch veränderte Zelle eine immortale oder eine immortalisierte Zelle, vorzugsweise eine Stammzelle, insbesondere ein embryonale Stammzelle ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die technisch veränderte Zelle genetisch modifiziert wurde, um einen oder mehrere Moleküle aus
25 der Gruppe enthaltend Cytokine, Chemokine und/oder kostimulatorische Moleküle zu exprimieren.

- 56 -

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das Cytokin und/oder Chemokin ausgewählt sind aus der Gruppe enthaltend GM-CSF, G-CSF, IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, IL 20, IL21, IL22, IFN α , IFN β , IFN γ , Flt3 L, Flt3, TNF α , RANTES,
5 MIP1 α , MIP1 β , MIP1 γ , MIP1 δ , MIP2, MIP2 α , MIP2 β , MIP3 α , MIP3 β , MIP4, MIP5, MCP1, MCP1 β , MCP2, MCP3, MCP4, MCP5, MCP6, 6cykine, Dck1 und DCDF.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 6, wobei das kostimulatorische Molekül ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend B7.1, B7.2, CD40, Light,
10 Ox40, 4.1.BB, Icos L, SLAMF; ICAM 1, LFA-3, B7.3, CD70, HSA, CD84, CD7, B7 RP-1 L, MAdCAM-1, VCAM-1, CS-1, CD82, CD30, CD120a, CD120b, TNFR-RP, CD40L, Ox40L und Rae1.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei das Cytokin, Chemokin und/oder kostimulatorische Molekül mindestens eine Punktmutation, Insertion, Deletion oder eine Fusion mit mindestens einem anderen Peptid oder
15 Protein ist.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Tumorerkrankung ein Melanom, Eierstockkrebs, Brustkrebs, Kolonkarzinom, Leukämie, Lymphom, Nierenkarzinom, Lungenkarzinom, Prostatakarzinom, zervikales Karzinom, Neuroblastom, Osteosarkom, Thymom, Hepatom, Kehlkopfkrebs,
20 Analkrebs, Magenkrebs, Schilddrüsenkrebs, Seminom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Mesencheliom und/oder Gehirntumor ist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Behandlung mit Chemotherapie, Bestrahlungstherapie oder der chirurgischen Entfernung des
25 Tumors oder der Metastase kombiniert ist.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Vakzine dazu geeignet ist, in Kombination mit einem Adjuvans ausgewählt aus der Gruppe enthaltend CpG, oxidiertes oder reduziertes Glutathion, BCG, Salmonella, komplettes Freundsches Adjuvans, inkomplettes Freundsches Adjuvans, 5 Cytokine oder Chemokine z.B. lösliche Proteine, Iscome oder spezifische Antikörper gegen CD40, Toll-artige Rezeptoren (aktivierend) oder CTLA4 (blockierend), eingesetzt zu werden.
12. Verwendung einer mindestens ein embryonales Tumorantigen exprimierenden Zelle zur Herstellung einer Vakzine zur Behandlung von Tumorerkrankungen 10 im Endstadium, wobei die Zelle nicht von der jeweiligen Tumorerkrankung abgeleitet wurde.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Zelle mindestens 3 Tumorantigene exprimiert.
14. Verwendung nach den Ansprüchen 12 oder 13, wobei die Zelle mindestens ein 15 Tumorantigen wie in Anspruch 2 definiert und/oder mindestens ein Cytokin, Chemokin und/oder kostimulatorisches Molekül wie in den Ansprüchen 5 bis 8 definiert exprimiert.
15. Verwendung nach den Ansprüchen 12 bis 14, wobei die Zelle eine Zelle wie in den Ansprüchen 3 oder 4 definiert ist.
- 20 16. Verwendung nach den Ansprüchen 12 bis 15, wobei die Tumorerkrankung wie in Anspruch 9 definiert ist.
17. Verwendung nach den Ansprüchen 12 bis 16, wobei die Behandlung wie in Anspruch 10 definiert ist.

- 58 -

18. Verwendung nach den Ansprüchen 12 bis 17, wobei die Vakzine dazu geeignet ist, in Kombination mit einem Adjuvans ausgewählt aus der Gruppe enthaltend CpG, oxidiertes oder reduziertes Glutathion, BCG, Salmonella, komplettes Freundsches Adjuvans, inkomplettes Freundsches Adjuvans, Cytokine
5 oder Chemokine z.B. lösliche Proteine, Iscome oder spezifische Antikörper gegen CD40, Toll-artige Rezeptoren (aktivierend) oder CTLA4 (blockierend), eingesetzt zu werden.
19. Arzneimittel zur Prophylaxe, Therapie und/oder sekundären Prophylaxe einer Tumorerkrankung enthaltend eine technisch veränderte Zelle gemäß einem der
10 Ansprüche 1 bis 8.
20. Arzneimittel nach Anspruch 19, wobei das Arzneimittel zusätzlich mindestens ein Adjuvans ausgewählt aus der Gruppe enthaltend CpG, oxidiertes oder reduziertes Glutathion, BCG, Salmonella, komplettes Freundsches Adjuvans, inkomplettes Freundsches Adjuvans, Cytokine oder Chemokine z.B. lösliche
15 Proteine, Iscome oder spezifische Antikörper gegen CD40, Toll-artige Rezeptoren (aktivierend) oder CTLA4 (blockierend), enthält.
21. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 19 oder 20, wobei das Arzneimittel dazu geeignet ist, subkutan, intrakutan, intravenös oder intranodal verabreicht zu werden.

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)